Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Sies

UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN MECHANISMUS DER LEBERTOXIZITÄT VON TETRACHLORKOHLENSTOFF

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi an der
Universität Düsseldorf
für das Fach Physiologische Chemie

vorgelegt von
Dipl.-Chem., Dr. rer. nat. Wolfgang Haas

Düsseldorf 1982

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Sies

UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN MECHANISMUS DER LEBERTOXIZITÄT VON TETRACHLORKOHLENSTOFF

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi an der
Universität Düsseldorf
für das Fach Physiologische Chemie

vorgelegt von
Dipl.-Chem., Dr. rer. nat. Wolfgang Haas

Düsseldorf 1982

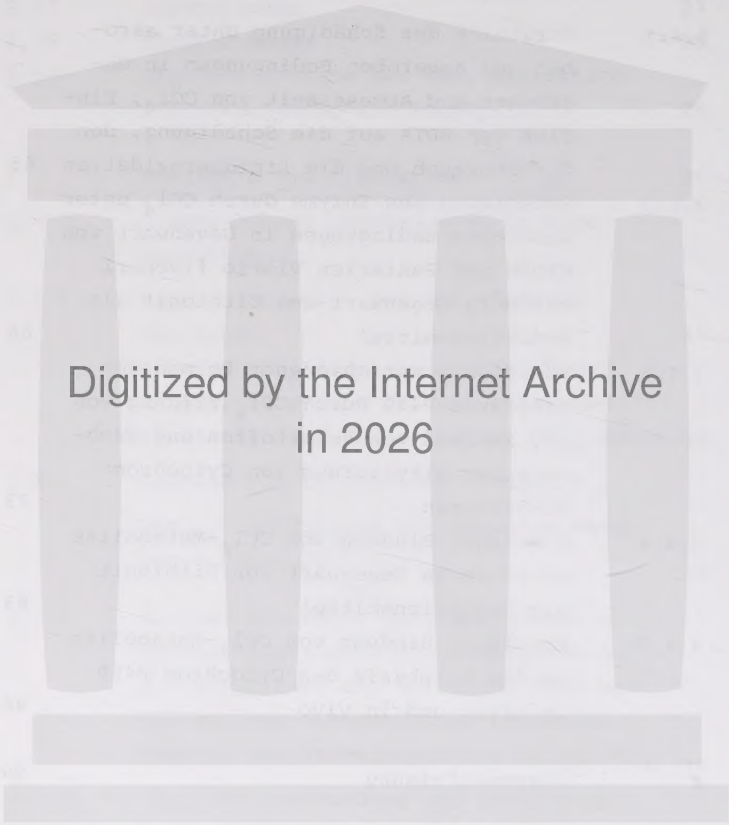
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Das mikrosomale Monooxygenasesystem	2
1.3	Cytochrom P450, ein monooxygenierendes System	4
1.4	Cytochrom P450, ein reduzierendes Enzym	8
1.5	Oxidativer und reduktiver Metabolismus von halogenierten Substanzen	9
1.6	Metabolisierung des Tetrachlorkohlenstoffs	10
1.7	Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs	11
1.8	Problemstellung	12
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel	19
2.2	Versuchstiere und deren Behandlung	19
2.3	Mikrosomenpräparation	20
2.4	Proteinbestimmungen	21
2.5	Trennung der Lipide von den Nichtlipiden und Bestimmung der Kovalentbindung von ^{14}C-Metaboliten	21
2.6	Calciumbestimmung	22
2.7	Bestimmung von NADPH und CO	22
2.8	Bestimmung der Komponenten des Monooxygenasesystems	22
2.9	Aktivitätsbestimmung der Glucose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9)	23
2.10	Aktivitätsbestimmung der mikrosomalen Nucleosiddiphosphatase (EC 3.6.1.6)	25
2.11	Aktivitätsbestimmung der UDP-Glucuronyltransferase (EC 2.4.1.17)	25
2.12	Bestimmung der in vitro Proteinsyntheserate	25

2.13	Bestimmung der Lipidperoxidation	26
2.14	Bestimmung der Diene	26
2.15	Bestimmung der O_2-Konzentration und Konstanthaltung der O_2-Konzentration	26
2.16	Elektrophorese	27
2.17	Inkubationen	27
2.18	Hämisolierung	29
2.19	Eisenfreisetzung aus Häm, Extraktion und Veresterung von Porphyrin	29
3	Resultate und Diskussion	31
3.1	Orientierende Messungen zu in vivo Versuchen	31
3.1.1	Zeitabhängigkeit des CCl_4-Gehalts der Leber	31
3.1.2	In vivo CCl_4-Kovalentbindung in der Leber, verteilung auf die Lebersubfraktionen und Variation der CCl_4-Dosis	33
3.2	Einfluß von Calcium und Vitamin D_3 auf die Schädigung mikrosomaler Parameter durch CCl_4	39
3.2.1	Einfluß des durch Calciumgluconat erhöhten hepatischen Calciumgehalts auf die Schädigung des Cytochrom P450 und der Glucose-6-Phosphatase sowie die Hemmung der Proteinsynthese durch CCl_4	39
3.2.2	CCl_4-Kovalentbindung und Schädigung mikrosomaler Parameter in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem Geschlecht, Schutzeffekt des Vitamin D_3	41
3.3	Schädigung der Glucose-6-Phosphatase, der Nucleosiddiphosphatase und der UDP-Glucuronyltransferase	51

3.3.1	Schädigung der Enzyme in vivo, Abhängigkeit von der CCl_4-Dosis und der Applikationsdauer	52
3.3.2	Schädigung der Enzyme in vitro unter pO_2-Stat und anaeroben Bedingungen	53
3.4	Schädigung des Cytochrom P450	58
3.4.1	Vergleich der Schädigung unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Gegenwart und Abwesenheit von CCl_4, Einfluß von EDTA auf die Schädigung, den O_2-Verbrauch und die Lipidperoxidation	65
3.4.2	Schädigung des Enzyms durch CCl_4 unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von NADPH und Bakterien Vibrio fischeri sowie in Gegenwart von Dithionit als Reduktionsmittel	66
3.4.3	Schädigung verschiedener Formen des Cytochrom P450 durch CCl_4, Bildung von CO, Einfluß von Hemmstoffen und Nachweis der Alkylierung von Cytochrom P450-Formen	73
3.4.4	Kovalente Bindung von CCl_4-Metabolite an Hämin in Gegenwart von Dithionit als Reduktionsmittel	83
3.4.5	Kovalente Bindung von CCl_4-Metabolite an das Porphyrin des Cytochrom P450 in vitro und in vivo	94
4	Zusammenfassung	99
5	Literaturverzeichnis	102



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0060

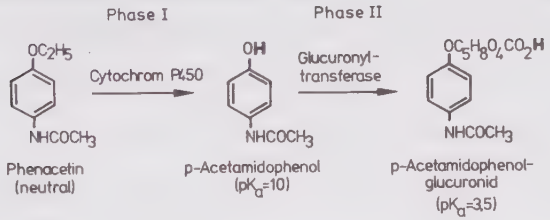
Abkürzungen

FMN	Flavin-mononucleotid
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotin-adenin-dinucleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotin-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form
PB	Phenobarbital
3-MC	3-Methylcholanthren
ER	endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat
UDP	Uridin-5'-diphosphat
DPPD	N,N'-Diphenyl-p-phenylendiamin
DC	Dünnschichtchromatographie
dpm	Zerfälle pro Minute

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Einführung

Die Menschheit ist einer Vielfalt fremder Stoffe natürlichen und, vor allem in hochindustrialisierten Räumen, synthetischen Ursprungs ausgesetzt. Diese körperfremden Stoffe (Xenobiotika), wie Medikamente, Pestizide, Lebensmittelzusätze und andere Chemikalien unterliegen in der Mehrzahl Stoffwechselreaktionen (Biotransformation). Die meisten Xenobiotika werden vorwiegend von Enzymen der Leber, aber auch der Nieren, des Darms und der Lunge chemisch verändert, metabolisiert. Der Metabolismus führt oft zu polareren Substanzen mit verminderter Toxizität (Entgiftung). Es können aber aus Xenobiotika, die nicht toxisch sind, durch Biotransformation toxische Metabolite entstehen, die z.B. Gewebsschädigungen und auch Krebs erzeugen (Giftung). Die Biotransformation von Xenobiotika läuft in der Regel in zwei Phasen ab, nämlich Oxidationen, Reduktionen oder Hydrolysen in der Phase I, Synthesen (Konjugationen) in der Phase II. Ein Beispiel ist der Metabolismus des fieber- und schmerzlindernden Arzneimittels Phenacetin:



Phenacetin, eine fettlösliche, neutrale Verbindung wird in der Phase I oxidativ zu einer schwachen Säure dealkyliert. Das entstehende p-Acetamidophenol (Paracetamol) bewirkt in hoher Konzentration auch beim Menschen Leber- und Nierennekrose. Der größte Teil des Paracetamols wird jedoch in der Phase II mit Glucuronsäure konjugiert zu p-Acetamidophenolglucuronid, das

als starke Säure gut wasserlöslich ist und über die Niere aus dem Körper entfernt werden kann. Beide Prozesse, die Giftung des Phenacetin und die Entgiftung des toxischen Metaboliten p-Acetamidophenol werden durch Enzyme der Leber katalysiert.

Die Enzyme der Leber, die an dem Metabolismus von Xenobiotika beteiligt sind, befinden sich hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER), einem intrazellulären Schlauchsystem der Parenchymzellen. Bei der Homogenisierung von Lebergewebe zerreißt das ER unter Bildung kleiner Bläschen, die durch Ultrazentrifugation als Mikrosomen abgetrennt werden können. An Mikrosomen lassen sich in vitro die Eigenschaften der Enzyme und die Mechanismen der Reaktionen mit Xenobiotika und auch körpereigenen, endogenen Substanzen untersuchen. Unser heutiges Wissen über die Biotransformation von Xenobiotika ist im wesentlichen auf in vitro und in vivo Experimente mit Versuchstieren begründet. Dieses in der Hoffnung, daß die dadurch gewonnenen Erkenntnisse auch für den Menschen gelten, was in vielen Fällen noch zu beweisen ist (1). Die Kenntnis der molekularen Prozesse, die Toxizität verursachen, ist wesentlich zur Erklärung und Risikobeurteilung toxischer Eigenschaften von Xenobiotika und bildet die theoretische Grundlage zur rationalen Entwicklung von Medikamenten und neuen Therapien.

1.2 Das mikrosomale Monooxygenasesystem

In Phase I der Metabolisierung von Xenobiotika kommt dem mikrosomalen Monooxygenasesystem der Leber überragende Bedeutung zu. Dieses System kann lipophile aliphatische und aromatische Verbindungen in polarere Metaboliten überführen und somit den Reaktionen der Phase II zugänglich machen. Das System besteht aus den Flavoproteinen NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (EC 1.6.2.4) und NADH-Cytochrom b_5-Reduktase

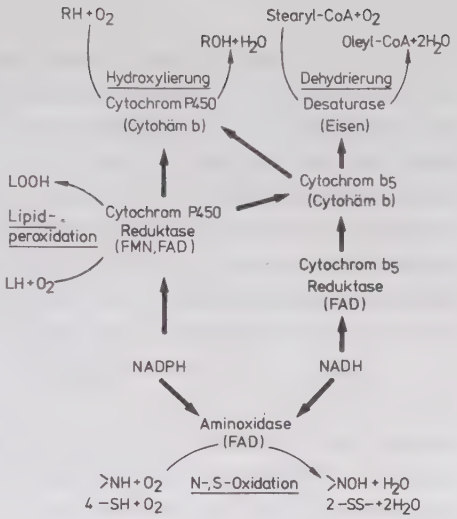


Abb. 1: Schematische Darstellung des mikrosomalen Elektronentransportsystems nach Estabrook (2). Die Endaktivitäten sind unterstrichen, die Aktivzentren der Enzyme in Klammern angegeben.

(EC 1.6.2.2), den Hämoproteinen Cytochrom b_5 und Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) und ist Bestandteil des mikrosomalen Elektronentransportsystems (Abb. 1). Die Elektronen gelangen über reduzierte Pyridinnukleotide in das System und werden in sauerstoffabhängigen Reaktionen verwendet. Das terminale Enzym der Monooxygenierung ist das Cytochrom P450, wo die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs erfolgt. Die Organisation des Systems in den Mikrosomen ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

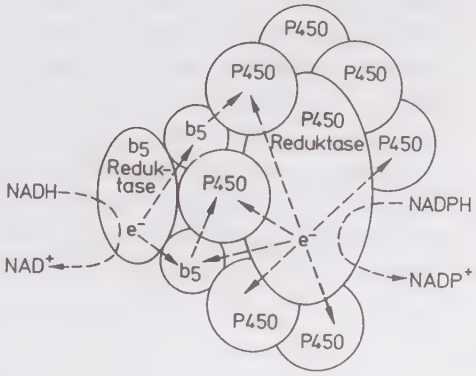


Abb. 2: Statisches Modell der Organisation des Monooxygenasesystems nach Estabrook (4).

An dem Aufbau der Mikrosomenmembran sind Proteine zu 70 %, davon bis zu 27 % Cytochrom P450, und Lipide zu 30 % beteiligt (3). Das Verhältnis von Cytochrom P450 zur Cytochrom P450-Reduktase ist ca. 20 : 1 (4).
Das Monooxygenasesystem der Leber und auch anderer Organe ermöglicht die Oxidation von endogenen Verbindungen und von Xenobiotika, wobei ein Mol molekularer Sauerstoff und zwei Mole Reduktionsäquivalente aus NAD(P)H zur Bildung von einem Mol Wasser und einem Mol oxidiertem Substrat benötigt werden:

$$R\text{-}H + NAD(P)H + O_2 + H^+ \longrightarrow R\text{-}OH + NAD(P)^+ + H_2O$$

Da nur ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut wird, wird der Vorgang als Monooxygenierung bezeichnet. Da das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird, ist auch die Bezeichnung des Vorgangs als mischfunktionelle Oxidation üblich.

Eine Übersicht über die Vielfalt der endogenen Substanzen, die durch Monooxygenierung verändert werden, wie Fettsäuren, Lipide und Steroidhormone gibt Brenner (5), über die Xenobiotika Sato und Omura (6).

1.3 Cytochrom P450, ein monooxygenierendes Enzym

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Cytochrom P450. Es wurde 1958 von Klingenberg (7) und Garfinkel (8) als ein Pigment entdeckt, das im reduzierten Zustand mit Kohlenmonoxyd einen Komplex bildet, der bei 450 nm eine starke Lichtabsorption aufweist. Das Enzym wurde 1964 von Omura und Sato (9) als Hämoprotein spektral quantifiziert. 1973 wiesen Maines und Anders (10) Eisen-Protoporphyrin IX als Aktivzentrum des Hämoproteins nach.
Cytochrom P450 ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Hämoproteinen mit verschiedener, teilweise überlappender Substratspezifität, die alle einen CO-Komplex mit einer intensiven Bande (Soret-Bande) bei 450 nm bilden. Diese Hämoproteine be-

sitzen eine unterschiedliche Primär- und Tertiärstruktur (Bothelho u. Mitarb.,1979), (11)). Kürzlich wurde die erste vollständige Primärstruktur eines Cytochrom P450 veröffentlicht (Haniu u. Mitarb., 1982, (12)). Eine kritische Übersicht über die Kriterien und Bedeutung multipler Formen des Cytochrom P450 gibt Johnson (13). Allen Cytochrom P450-Formen, sie besitzen ein Molekulargewicht um 52 000 Dalton, ist ein Thiolatligand an der fünften Koordinationsstelle des Häm gemeinsam, der für die ungewöhnlichen spektralen Eigenschaften verantwortlich ist (14); die CO-Komplexe anderer Hämoproteine weisen im Differenzspektrum ein Maximum bei 420 nm auf. Das Cytochrom P450 kann durch Detergenzien, Lipasen und Proteasen, organische Lösungsmittel und durch hohe Salzkonzentrationen inaktiviert werden und weist dann, wie die anderen Hämoproteine, ein spektrales Maximum bei 420 nm auf (15). In dieser Arbeit wird nur zwischen den drei Hauptgruppen des Cytochrom P450 unterschieden: nämlich den sogenannten konstitutiven Formen unbehandelter Tiere und den induzierbaren Formen aus Phenobarbital (PB) vorbehandelten Tieren, die ein Maximum bei 450 nm aufweisen, und den mit 3-Methylcholanthren (3-MC) induzierbaren Formen, die ein Maximum bei 448 nm zeigen. Über die Mechanismen und die Genetik der Induktion sei auf die Übersichtsartikel von Bock und Remmer (16) und Nebert u. Mitarb. (17) verwiesen.

Bei der Isolierung der Mikrosomen entsteht je nach Präparationsbedingungen und Tierspezies ein Gleichgewicht an Cytochrom P450 in verschiedenen Spinzuständen des hämgebundenen Fe^{3+}, das in der "low spin" oder der "high spin" Form vorliegen kann (Abb. 3). Das Gleichgewicht des Spinzustandes moduliert die Substratbindung und das Oxidations-Reduktionspotential des Cytochrom (18). In der low spin Form ist der sechste Ligand des Häm-Fe^{3+} ein Sauerstoff (19), der bei der Bindung eines Substrats verdrängt wird. Bei der Bindung eines lipophilen Substrats, z.B. CCl_4, verschiebt sich das Gleichgewicht von low spin Fe^{3+} zu high spin Fe^{3+}. Dadurch wird die Soret-Bande des Cytochrom P450

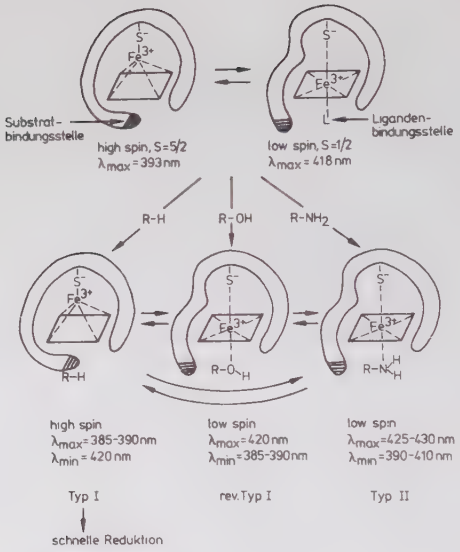


Abb. 3: Spinzustände und Bindungsmöglichkeiten an oxidiertes Cytochrom P450 nach Kumaki und Nebert (21).

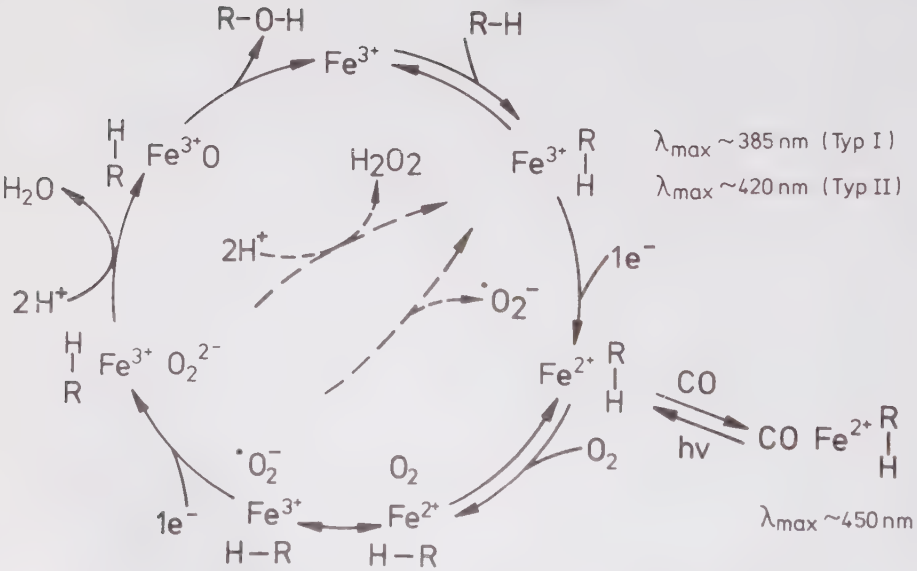


Abb. 4: Reaktionszyklus des Cytochrom P450 bei der Monooxygenierung eines Substrats R-H nach Estabrook (22).

von 418 nm nach 392 nm verschoben, was sich in Mikrosomen durch ein Differenzspektrum mit einem Maximum bei ca. 390 nm und einem Minimum bei ca. 420 nm (Typ I-Spektrum) bemerkbar macht. Bei der Bindung eines Substrats, das als 6. Ligand des Fe^{3+} fungiert, verschiebt sich das Gleichgewicht zu low spin Fe^{3+}, was ein Differenzspektrum des Typs Ia oder II ergibt. Solche Liganden können als Hemmstoff der mikrosomalen Monooxygenase wirken, auch weil die Reduktion des Cytochrom P450-Substrat-Komplexes in der high spin Form erfolgt und die Gleichgewichtseinstellung von low spin zu high Spinzustand langsam ist (20).
Die Substratbindung (Abb. 3) ist der erste Schritt des Monooxygenierungszyklus (Abb. 4). Der high spin Enzym-Substrat-Komplex wird durch die Aufnahme eines Elektrons reduziert und bindet mit hoher Affinität Sauerstoff. Dieser ternäre Oxykomplex wird durch ein weiteres Elektron formal zu einem Peroxidkomplex reduziert. Nach Abspaltung von Wasser bildet sich der Oxenkomplex, der unter Abspaltung des oxygenierten Substrats wieder oxidiertes Cytochrom P450 bildet (22,23).

Der aktive Sauerstoff des Oxenkomplexes kann sich in primäre, sekundäre und tertiäre CH-Bindungen unter Bildung einer Alkoholgruppe einschieben. Durch Addition des Oxen an isolierte CC-Doppelbindungen bilden sich Epoxide und durch Addition an aromatische CC-Doppelbindungen entstehen Arenoxide, die sich zu Phenolen umlagern. Thioäther als Substrate könnnen durch das Oxen am Schwefel und Amine am Stickstoff oxidiert werden (5,6).

Das erste Elektron im Oxygenierungszyklus stammt von NADPH, das zweite kann, abhängig vom Substrat, zusätzlich von NADH über Cytochrom b_5 an das Cytochrom P450 geliefert werden, was eine mehr als additive Beschleunigung der Monooxygenierung bewirken kann im Vergleich zu den Reaktionen, die nur in Gegenwart von NADPH oder NADH ablaufen (synergistischer Effekt (24)).

Als Nebenreaktionen der Monooxygenierung kann der Oxykomplex unter Bildung eines Superoxidanions und des oxidierten Substrat-Enzym-Komplexes dissoziieren. Das $\cdot O_2^-$-Radikal disproportioniert, durch die Superoxiddismutase katalysiert, zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, das möglicherweise auch durch die Dissoziation des Peroxidkomplexes direkt entstehen kann (22). Nach der Bindung von perfluorierten Verbindungen an Cytochrom P450 findet keine Monooxygenierung statt, aber NADPH wird unter Bildung von Wasser aus O_2 verbraucht. Diese Oxidaseaktivität des Cytochrom P450, die Elektronenübertragung von NADPH auf O_2 unter Bildung von Wasserstoffperoxid oder Wasser, wird auch als "Entkopplung" bezeichnet, da dabei keine Monooxygenierung erfolgt (23).

1.4 Cytochrom P450, ein reduzierendes Enzym

Im Gegensatz zu anderen Cytochromen und terminalen Oxidasen besitzt das Cytochrom P450 ein niedriges Redoxpotential in der Nähe der Wasserstoffelektrode (-420 mV) (25). Wickramsinghe und Villee (26) sehen unter anderem darin einen Hinweis, daß Cytochrom P450 ein archetypisches Enzym ist, das in der reduktiven Uratmosphäre der Erde die Aufgabe hatte, Spuren von Sauerstoff zu entfernen. In der heutigen oxidativen Atmosphäre ist molekularer Sauerstoff der physiologische Elektronenakzeptor des Cytochrom P450 bei katabolischen und anabolischen Reaktionen mit Substraten. Bei der Monooxygenierung wird ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert und durch Entkopplung der Monooxygenierung kann neben Wasser auch Wasserstoffperoxid gebildet werden (1.3). Cytochrom P450 wirkt folglich für molekularen Sauerstoff als Reduktase.

Reduktasereaktionen des Cytochrom P450 mit Substraten, die reduzierbare funktionelle Gruppen besitzen, sind im Vergleich zu den Monooxygenasereaktionen nur wenig untersucht. Die bekannten Fälle sind ausschließlich Reaktionen mit Xenobiotika.

So ist Cytochrom P450 an der Reduktion von aromatischen Nitroverbindungen (27), Azoverbindungen (28), tertiären Amin-N-Oxiden (29), Arenoxiden (30) und halogenierten Kohlenwasserstoffen (31,32) beteiligt. Die Reduktionen werden durch hypoxische Bedingungen erleichtert und durch Kohlenmonoxid zumindest teilweise gehemmt. Letzteres, weil die Cytochrom P450-Reduktase ebenfalls Xenobiotika und deren Metabolite reduzieren kann (28,30).

1.5 Oxidativer und reduktiver Metabolismus von halogenierten Substanzen

Die chemische Struktur von halogenierten Substanzen bestimmt deren metabolisches Schicksal.
Aromatische Halogenverbindungen, z.B. chlorierte Biphenyle, die als Umweltchemikalien lebertoxisch sind, werden epoxidiert. Die Arenoxide binden kovalent an Proteine, auch an Cytochrom P450 und Cytochrom P450-Reduktase (33). Haloalkane, die Doppelbindungen enthalten, wie Tetrachlorethylen, CCl_2CCl_2, oder Vinylchlorid, CH_2CHCl, werden ebenfalls durch Monooxygenierung epoxidiert (34,35). Die Epoxide sind reaktive Metabolite, die direkt oder nach Oxiranumlagerung zu Säurechloriden an zellulären Bestandteilen binden. Das Epoxid des Vinylchlorid gilt als Leberkarzinom verursachender Metabolit (35).

Haloalkane mit CH-Bindungen werden hydroxyliert. Chloroform, $CHCl_3$, wird durch Monooxygenierung mit nachfolgender Elimination von HCl zu Phosgen, $COCl_2$, metabolisiert, das als einziger reaktiver Metabolit die hepatotoxische Wirkung dieses früher als Narkosemittel verwendeten Halomethans verursacht (36). Aus Halothan, $CF_3CHClBr$, entsteht $CF_3C(OH)ClBr$, das nach HBr-Elimination und anschließender Hydrolyse CF_3COOH bildet (37), was als Entgiftung gewertet wird. Die kovalente Bindung von Halothan und die Hepatotoxizität dieses Narkosemittels werden durch hypoxische

Bedingungen gesteigert (38). Unter zunehmend hypoxischen Bedingungen entstehen zunehmend reduktiv gebildete Metabolite; CF_3CH_2Cl, das Carben $CF_3\bar{C}Cl$, das als Cytochrom P450-Komplex in der isoliert perfundierten Leber spektral nachgewiesen wurde (31) und CF_2CHCl (39).

Perhaloalkane können nicht monooxygeniert werden. Sie werden reduktiv dehalogeniert. Aus Hexachlorethan entstehen Pentachlorethan und Tetrachlorethylen. Die reduktive Dehalogenierung wird durch hypoxische Bedingungen begünstigt (32).

1.6 Metabolismus des Tetrachlorkohlenstoffs

Die Metabolisierung des CCl_4 als Perhalomethan muß reduktiv erfolgen,zumindest im ersten Schritt. Dazu läßt sich analog zum Monooxygenierungszyklus (Abb. 4) ein Reduktionszyklus des Cytochrom P450 formulieren (Abb. 5). Die Einelektronenreduktion des Typ I Substrats führt unter Abspaltung von Cl^- zum $^{\cdot}CCl_3$-Radikal. Dieses, 1961 von Butler postuliert (40) und durch die Bildung seines Dimeren, CCl_3CCl_3, 1969 wahrscheinlich gemacht (41), konnte erst 1980 (42) eindeutig nachgewiesen werden, sowohl in vitro als auch in vivo.
Die weitere Reduktion führt wiederum unter Cl^--Elimination zum Dichlorcarben (43,44), was noch umstritten ist (45).
Die Hydrolyse des Carben führt zu CO, das in vitro in geringen Mengen als Metabolit des CCl_4 entsteht (44); das Alternativprodukt der Carbenhydrolyse, Ameisensäure (Abb.6) wurde bisher nicht nachgewiesen.
Chloroform wurde in vivo (41,46) und in vitro (47,48,44) als Metabolit nachgewiesen. Es entsteht teilweise aus dem Fe^{3+}-CCl_3^--Komplex, im wesentlichen jedoch durch $^{\cdot}H$-Abstraktionsreaktion des $^{\cdot}CCl_3$-Radikal aus der Membran (44).

CO_2 (in vivo, 46) und $COCl_2$ (in vitro, 49) sind CCl_4-Metabolite, die entweder über $CHCl_3$ oder das in vitro nachgewiesene $^{\cdot}O_2CCl_3$-Radikal (50) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff entstehen (s. Abb. 6).

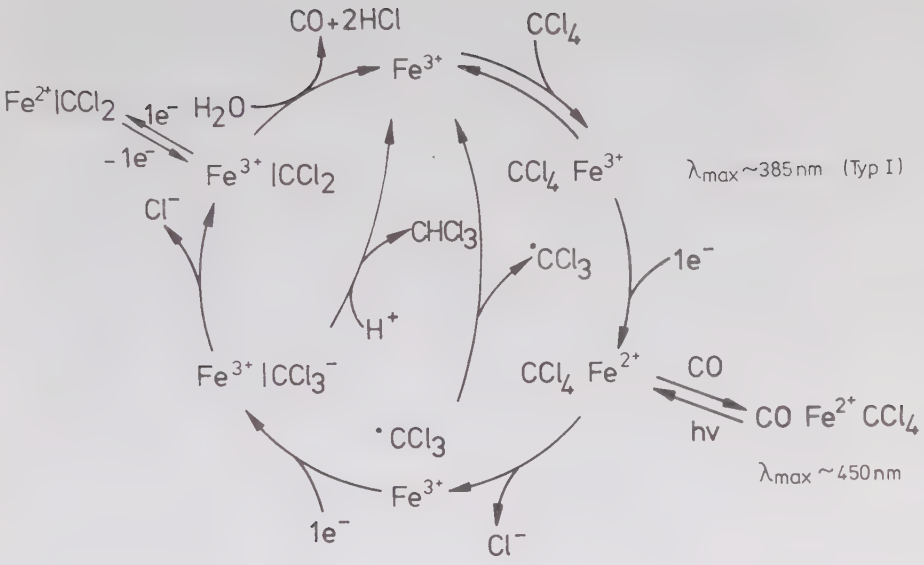


Abb. 5: Reaktionszyklus des Cytochrom P450 bei der reduktiven Dehalogenierung in Analogie zu Abb. 4.

Die Komplexität des Metabolismus einer im chemischen Sinne einfachen Verbindung wie CCl_4 zeigen auch kürzlich beschriebene elektrophile Substitutionsreaktionen von Cl^+ aus CCl_4 in vitro (51).
Zu allem kommt noch die Frage, welche Cytochrom P450-Formen am Metabolismus des CCl_4 beteiligt sind und daß neben den Cytochromen P450 auch die Cytochrom P450-Reduktase metabolischer Ort sein könnte (52,53).

1.7 Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs

CCl_4 ist nicht mutagen (54) und nur schwach karzinogen (55, 56). Es verursacht leberspezifisch Nekrose. Der zeitliche Ablauf der Leberschädigung aus morphologischer und biochemischer Sicht ist in jahrzehntelanger Arbeit durch in vivo

und in vitro Versuche weitgehend geklärt (57-60). Die ersten Schädigungen treten am ER wenige Minuten nach CCl_4-Gabe auf: die Aktivität endoplasmatischer Enzyme, z.B. des Cytochrom P450, nimmt ab, CCl_4-Metabolite binden kovalent an Membranproteine und Membranlipide, die Lipide werden peroxidativ verändert (Zunahme der Dienkonjugation), RNA wird an das Cytosol abgegeben, die Proteinsynthese und die Sekretion von Lipoproteinen nehmen ab, der Lebergehalt an NADPH und $NADP^+$ verringert sich und Ribosomen lösen sich vom ER, das seine Struktur verändert. Der Lebercalciumgehalt nimmt vorübergehend zu. Innerhalb von Stunden treten cytosolische Enzyme aus der anschwellenden Zelle, Triglyceride akkumulieren, Calcium akkumuliert in den Mitochondrien, die Lysosomen und der Zellkern lösen sich auf und nach 24 Stunden ist eine zentrilobuläre Nekrose gegeben. Die Dosis, bei der nach 24 Stunden histologisch noch eine Nekrose nachweisbar ist, beträgt bei Ratten 0.83 mMol (0,08 ml) CCl_4 pro kg (61). Die LD_{50} (24 h) liegt bei ca. 2o mMol (1,9 ml) CCl_4/kg Ratte (111).

1.8 Problemstellung

Der Mechanismus der Metabolisierung von CCl_4 ist bis heute qualitativ und vor allem quantitativ nicht vollständig geklärt. Dieses liegt zu einem Teil an der Fülle der möglichen reaktiven Metabolite und zum anderen an der O_2-Abhängigkeit des Metabolitmusters. Selbst wenn dieses gelöst wäre, fehlt zwischen den Metaboliten und den Schädigungen das Bindeglied. Die Bindung zwischen Giftung und Wirkung von Xenobiotika zu knüpfen, ist im speziellen Fall des Tetrachlorkohlenstoffs das Ziel dieser Arbeit.

Während des letzten Jahrzehnts wurden zwei Lösungswege beschritten.
Die Bindungshypothese versucht die Schädigung der Leber durch direkte Wechselwirkung der reaktiven CCl_4-Metabolite mit den

Wirkorten zu erklären. Grundlage dieser Hypothese ist die Beobachtung, daß CCl_4-Metabolite kovalent an Lipide und Proteine des ER (48,60-64) und des Zellkerns (65) binden.

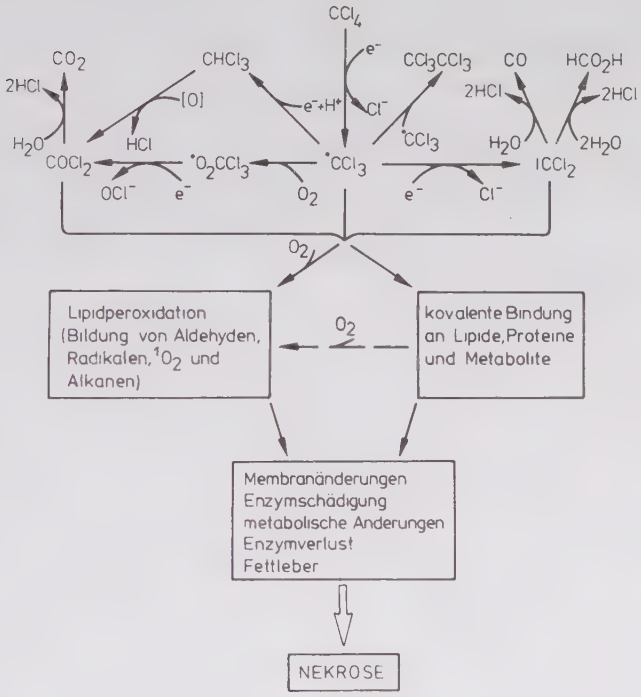


Abb. 6: Reduktiver, O_2-unabhängiger und O_2-abhängiger Metabolismus von CCl_4 und mögliche Beteiligung der reaktiven Metabolite an der toxischen Wirkung.

Die Lipidperoxidationshypothese hingegen postuliert indirekte Schädigungsmechanismen. Dabei sollten reaktive CCl_4-Metabolite am ER als Ort der Giftung den peroxidativen Abbau von ungesättigten Fettsäuren der Lipidmembran einleiten (Abb. 7).

Diese O_2-abhängigen, komplexen Peroxidationsreaktionen (66) führen neben der Veränderung der gesamten endoplasmatischen Membran zur Bildung reaktiver und auch längerlebiger Sekundärmetabolite, die auch Wirkorte außerhalb des ER erreichen sollen. Die toxische Wirkung des CCl_4 wird durch die Membranänderung des ER und durch direkte Wechselwirkung der Sekundärmetabolite, wie Malondialdehyd (Abb. 7), Hydroxyaldehyde und Alkenale mit zellulären Bestandteilen erklärt (58,60,67-69). Als Maßstab der Lipidperoxidation gelten die Abnahme an ungesättigten Fettsäuren (70,71), die Zunahme von Lipiddienen (72,73), die Bildung von Lipidperoxiden und Malondialdehyd (52) und die Bildung von Alkanen (74-76). Die Lipidperoxidationsparameter sind in ihrer Bedeutung jedoch umstritten.

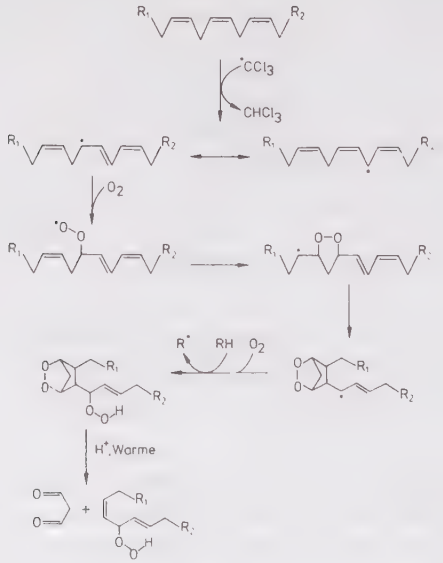


Abb. 7: Mechanismus der Malondialdehydbildung aus ungesättigten Fettsäuren über prostaglandinähnliche Endoperoxide, vereinfacht nach Pryor u. Mitarb. (79).

So kann die vermehrte Alkanausatmung als nicht invasiver Maßstab der in vivo Lipidperoxidation auch durch eine verminderte Metabolisierung der Alkane durch Monooxygenasen der Leber erklärt werden, ohne daß eine durch Xenobiotika verursachte Lipidperoxidation vorausgesetzt werden muß (77). Ferner korreliert die Ethanausatmung nicht immer mit dem Ausmaß der Lebernekrose (117). Nach (73) verursacht CCl_4 in vivo eine vermehrte Dienbildung, nach (154) jedoch nicht. Zudem bewirkt CCl_4 in vitro unter O_2-freien Bedingungen, bei denen keine Lipidperoxidation erfolgt, eine Zunahme der Dienkonjugation in mikrosomalen Lipiden (78). In vivo können Diene auch bei unveränderter Ethanausatmung vermehrt gebildet werden (74).
Die Bildung von Lipidperoxiden und Malondialdehyd konnte nur in vitro nachgewiesen werden. Wie eine neuere Untersuchung an isolierten Hepatocyten (75) zeigt, korreliert jedoch der klassische Lipidperoxidationsparameter, die Malondialdehydbildung, mit der Bildung von Ethan und fluoreszierender Produkte, sowie der Chemilumineszenz, sobald die Zellen ihre Vitalität verlieren. Trotz der Unsicherheit in der Bewertung lipidperoxidativer Parameter ist die Peroxidationshypothese stets attraktiv; dieses, weil die Toxizität des CCl_4 histologisch mit Änderungen von Membranstrukturen verbunden ist und die physiologische Funktion membranständiger Enzyme naturgemäß von der Integrität der Membran abhängig ist. Experimentell faßbarer ist hingegen durch die Verwendung radioaktiv markierten CCl_4 die Kovalentbindungshypothese. Beide Hypothesen schließen sich nicht gegenseitig aus.

Bislang konnte noch in keinem Fall ein konkreter Beweis für oder gegen eine der beiden Hypothesen erbracht werden. Die Argumentationen basieren auf indirekten Beweisen. Um die Diversität der biochemischen Folgeereignisse der CCl_4-Vergiftung zu minimalisieren, beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf die Primärereignisse am ER; dieses ohne den An-

spruch zu erheben, daß die Primärereignisse selbst direkte Ursache für die Genese der Lebernekrose sind. Die Primärereignisse beinhalten vor allem die Schädigung mikrosomaler Enzyme. Bislang konnte noch in keinem Fall die Enzymschädigung durch kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten im Sinne der Bindungshypothese nachgewiesen werden. Gesichert ist lediglich, daß CCl_4 am ER der Leberparenchymzelle reduktiv zu dem Trichlormethylradikal (Abb. 6) metabolisiert wird, CCl_4-Metabolite kovalent an endoplasmatische Lipide und Proteine binden und am ER die ersten biochemisch faßbaren Enzymschädigungen nachweisbar sind. Konkretes Ziel der Arbeit ist der Versuch, den Nachweis einer CCl_4-Metabolitbindung an endoplasmatische Enzyme zu erbringen.
Der O_2-Konzentration kommt in dieser Arbeit eine wichtige Bedeutung zu. Zunächst unterliegen die Leberparenchymzellen und deren Kompartimente von der portalen zur zentrilobulären Region abfallenden O_2-Gradienten (0,1 mM - 0,1 µM (80)). Die CCl_4-initiierte Lipidperoxidation besitzt ein K_m (O_2) 35 µM (81), das K_m (O_2) von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenierungen ist um eine Größenordnung kleiner (5 µM - 1 µM (82,83)). Das K_m (O_2) des Cytochrom P450 liegt bei ca. 0,1 µM - 0,7 µM (84,85). Für die Bindung von CCl_4 an oxidiertes Cytochrom P450 wird ein K_s (CCl_4) = 0,5 mM (86) und an reduziertes Cytochrom P450 von 40 µM und 19 µM angegeben (86,87). Die K_m (O_2) der O_2-abhängigen Bildung von CCl_4-Metaboliten (vergl. Abb. 6) sind nicht bekannt. Somit bietet sich keine Möglichkeit, Voraussagen über die Bedeutung der einzelnen Prozesse in vivo zu treffen. Durch in vitro Versuche, bei denen die O_2-Konzentration definiert werden kann, ist es jedoch möglich, die Bedeutung der O_2-abhängigen Reaktionen in bezug auf die Schädigung mikrosomaler Enzyme einzuschätzen. Untersuchungen unter definierten anaeroben Bedingungen sollen Aufschluß geben, in welchem Umfang die Schädigung mikrosomaler Enzyme O_2-abhängig ist. Dabei muß in Anbetracht der hohen Sauerstoffaffinität des Cytochrom P450 der Restsauer-

stoffgehalt im mikro- und submikromolaren Bereich bestimmt werden.

Ein erster Schwerpunkt der Untersuchung ist die Bedeutung des erhöhten Lebercalciumgehalts bei der Schädigung der Enzyme des Monooxygenasesystems durch CCl_4. Als Maßstab der CCl_4-Metabolisierung wird die kovalente Bindung von CCl_4 an Lipide und Proteine der Leber verwendet. Ausgangspunkt war der von Kröner und Planker (88) beschriebene Schutzeffekt des durch Vitamin D-Vorbehandlung bewirkten erhöhten Calciumgehalts der Leber auf die zeitlich spätere Phase des CCl_4-Toxizität, des Enzymverlusts der Leber. Ein Schutzeffekt des erhöhten Lebercalciums auf die zeitlich frühere Schädigung endoplasmatischer Enzyme müßte bei Gültigkeit der Bindungshypothese zu einem verringerten Einbau von CCl_4-Metaboliten führen. In Abgrenzung zur Bindungs- und Lipidperoxidationshypothese ist ein weiterer Schädigungsmechanismus durch die Erhöhung des Lebercalciums möglich. Dieser könnte durch die Aktivierung einer cytosolischen Protease (89) und einer endoplasmatischen Phospholipase (90) durch Calcium bewirkt werden. Dieser Mechanismus wurde durch eine von Vitamin D unabhängige Erhöhung des Lebercalciums untersucht.

Eine weitere Eingrenzung der Schädigungsmechanismen durch CCl_4 erfolgte durch die Untersuchung des Latenzverhaltens der Glucose-6-Phosphatase, der Nucleosiddiphosphatase und der UDP-Glucuronyltransferase. Diese endoplasmatischen Enzyme, die nicht Bestandteil des Monooxygenasesystems sind, können durch Detergenzien aus der Membran herausgelöst und in ihrer Aktivität untersucht werden. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, die direkte Schädigung dieser Enzyme durch CCl_4-Metabolite und Sekundärmetabolite der Lipidperoxidation von der indirekten Schädigung durch Membranveränderung zu differenzieren. Eine noch weitergehende Unterscheidungsmöglichkeit wird durch Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen erreicht. Dadurch können die notwendig O_2-abhän-

gigen Lipidperoxidationsprozesse als Schädigungsmöglichkeit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus werden unter anaeroben Bedingungen die reaktiven Metabolite Phosgen und das $^{\cdot}O_2CCl_3$-Radikal (Abb. 6) nicht gebildet und können dadurch als Ursache der Membranschädigung und der Enzymschädigung ausgeschlossen werden.

Den letzten Schwerpunkt der Arbeit bildet die Untersuchung des Schädigungsmechanismus des Cytochrom P450. Cytochrom P450 ist als Ort der Metabolisierung des CCl_4 das Enzym, das mit der größten Wahrscheinlichkeit auch durch kurzlebige reaktive Metabolite geschädigt werden kann. Es soll geklärt werden, welche Formen des Cytochrom P450 an der Metabolisierung des CCl_4 beteiligt sind und welche reaktiven Metabolite als Ursache der Schädigung in Frage kommen. Abschließend wird versucht, den Ort der Schädigung nachzuweisen, um den Beweis eines suizidalen Mechanismus zu erbringen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel

Handelsübliche Chemikalien, Enzyme, Enzymsubstrate und Labor-gase wurden in der reinsten Form bezogen und, sofern nicht besonders erwähnt, ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Metyrapon und die Detergenzien Renex 690 und Brij 58 wurden von den Firmen Ciba-Geigy und Atlas-Chemie kostenlos zur Verfügung gestellt.
$^{14}CCl_4$, 1-^{14}C-Leucin, ^{14}C- und ^{3}H-Standards wurden von Amersham und ϑ[3,5-^{3}H(N)]-Aminolävulinsäure von NEN bezogen.

Die Photobakterien Vibrio fischeri (ATCC 7744) stammten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen in Göttingen.

Natriumgluconat wurde aus handelsüblichen Calciumgluconat durch Kationenaustauschchromatographie (Dowex 50 W-X-8) gewonnen mit einer atomabsorptiometrisch bestimmten Reinheit von 0,4 ‰ Calcium in bezug auf Natrium.

Mesohäm wurde nach Smith (91) aus handelsüblichen Mesopor-phyrin synthetisiert. Der Reinheitsgrad nach chromatographi-scher Reinigung war größer als 99 % in Bezug auf die fluori-metrisch bestimmte Verunreinigung durch Porphyrine.

Alle handelsüblichen Porphyrine und deren Dimethylester wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt und waren in mindestens drei Fließmittelsystemen einheitlich.

2.2. Versuchstiere und deren Behandlung

Versuchstiere waren geschlechtsreife weibliche und männliche Wistarratten aus eigener Zucht mit einem Körpergewicht zwi-schen 150 und 360 g. Die Tiere erhielten das Standardfutter 1310 der Firma Altromin, Lage/Lippe, und Trinkwasser ad libitum. 12 Stunden vor CCl_4-Applikation wurde den Tieren das Futter entzogen.

Die Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital (PB), 3-Methylcholanthren (3-MC), Vitamin D_3 und ^{3}H-Aminolävulinsäure und die Behandlung mit CCl_4 ($^{14}CCl_4$) sind in Art und Konzentration in den Legenden der Tabellen und Abbildungen angegeben. Die Applikation des CCl_4 erfolgte ausschließlich intraperitoneal.

2.3 Mikrosomenpräparation

Den Tieren wurde unter Äthernarkose die Bauchhöhle und der Brustkorb geöffnet und die Leber in situ über den rechten Vorhof des Herzens mit eiskalter 0,15 M KCl-Lösung retrograd blutfrei gespült, bei einem Druck von 40 cm Wassersäule. Die Leber wurde aus der Bauchhöhle herauspräpariert, mit einer Schere zerkleinert und in einem vierfachen Volumen eiskalter 0,15 M KCl-Lösung mit einem Teflon-Glas-Homogenisator (Potter-Elvehjem mit 0,3 mm Toleranz zwischen Teflonstempel und Glaswand) während 2 min bei 25 Hüben und 700 Upmin homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 750 g und nachfolgend 20 min bei 14500 g bei 4°C zentrifugiert. Aus dem dekantierten Überstand wurden nach 60 min bei 105000 g und 4°C die Mikrosomen als Sediment gewonnen.

Zur Reinheitsgradbestimmung der Mikrosomenfraktion wurde die mitochondriale Verunreinigung durch die Bestimmung der Succinatdehydrogenase (92), die lysosomale Verunreinigung durch die saure Phosphatase (93) und die cytoplasmatische Verunreinigung durch die Lactatdehydrogenase (94) in ihrer Aktivität im Vergleich zur Aktivität im Gesamthomogenat bestimmt. Das Homogenat wurde vor der Aktivitätsbestimmung der Enzyme mit Renex 690 (Endkonzentration 0,1 %) versetzt, um nicht aufgeschlossene Zellen aufzubrechen. In drei unabhängigen Bestimmungen fanden sich in der Mikrosomenfraktion eine Aktivität der Succinatdehydrogenase von 0,6 $\pm$ 0,1 %, der sauren Phosphatase von 4,5 $\pm$ 1,0 % und der Lactatdehydrogenase von 2,2 $\pm$ 0,8 % der jeweiligen Aktivitäten im Gesamthomogenat.

Die Mikrosomenausbeute, bestimmt durch den Cytochrom P450-Gehalt im Gesamthomogenat zum Gehalt in den Mikrosomen, war mit 41 $\pm$ 4 %

unabhängig von der Vorbehandlung der Tiere. Abweichende Präparationsbedingungen sind in den Legenden der Tabellen und Abbildungen angegeben.

2.4 Proteinbestimmungen

Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin der Firma Behring verwendet. Abhängig von den experimentellen Bedingungen wurden die Methoden von Goa (95), Lowry (96) oder Schacterle (97) zur Proteinbestimmung benutzt.

2.5 Trennung der Lipide von den Nichtlipiden und Bestimmung der Kovalentbindung von ^{14}C-Metaboliten

Die Lipide wurden nach der Methode von Folch (98) mit $CHCl_3$/MeOH (2:1, v/v) aus dem Leberhomogenat und den Lebersubfraktionen extrahiert und gravimetrisch quantifiziert. Der Phosphatgehalt der Lipide wurde nach feuchter Veraschung nach Burck (99) und nachfolgender Phosphatbestimmung nach der Methode von Weil-Malherbe (100) bestimmt. Die Abtrennung der Phospholipide von den Neutrallipiden erfolgte nach Kates (101).

Die Nichtlipidfraktion enthält nach der Extraktion der Lipide alle Bestandteile der wäßrigen Methanolphase und die Schicht zwischen der $CHCl_3$- und der wäßrigen Methanolphase.

Nicht metabolisiertes $^{14}CCl_4$ und flüchtige $^{14}CCl_4$-Metabolite wurden aus dem Homogenat und den Lipid- und Nichtlipidfraktionen durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums aus den Lösungen entfernt. Falls nötig, wurde zur Entfernung der nicht kovalent gebundenen Radioaktivität nicht radioaktiv markiertes $CCl_4/CHCl_3$ (2:1, v/v) zu den Lösungen gegeben und diese mehrfach nachfolgend evakuiert und mit Argon begast, bis eine konstante Radioaktivität der Lösungen gegeben war. Die Messung der Radioaktivität erfolgte durch Flüssigkeitsszintillation.

2.6 Calciumbestimmung

Die Calciumbestimmung erfolgte atomabsorptiometrisch. Die zu bestimmenden Proben wurden nach Burck (99) verascht. Die Probenlösungen enthielten zum Ausgleich von Ionisationsinterferenzen 5 % NaCl.

2.7 Bestimmung von NADPH und CO

Die Bestimmungen erfolgten nach Wolf (43). Die NADPH-Konzentration wurde aus der Absorptionsdifferenz zwischen 340 und 500 nm unter Verwendung des molekularen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{340-500} = 6{,}2 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ ermittelt. Die CO-Konzentration wurde durch die Bildung des CO-Hämoglobinkomplexes aus der Absorptionsdifferenz zwischen 419 und 425 nm bestimmt. Die Eichung der spektralen Änderung erfolgte durch Zugabe kleiner, definierter Volumina CO-gesättigten Wassers (1,0 mM, 20°C (43)) in Aliquote des Inkubationsansatzes, um spektrale Interferenzen z.B. durch Komplexbildung des Cytochrom P450 mit CCl_4 bzw. CO auszugleichen.

2.8 Bestimmung der Komponenten des Monooxygenasesystems

Cytochrom P450 wurde nach Omura und Sato (9) als dithionitreduzierter CO-Komplex gegen dithionit-reduziertes Cytochrom P450 spektral bestimmt ($\varepsilon_{450-490} = 91 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$). Die Bestimmung des Cytochrom P450 im Leberhomogenat wurde in Gegenwart von 0,1 % Renex 690 durchgeführt. Die Zugabe des Detergens führte zum quantitativen Aufschluß noch intakter Zellen, ohne das Cytochrom P450 zu Cytochrom P420 zu denaturieren.

Cytochrom b_5 wurde ebenfalls nach Omura und Sato (9) als NADH-reduziertes gegen oxidiertes Cytochrom b_5 bestimmt ($\varepsilon_{424-409} = 185 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$). Abweichend von Omura und Sato wurde zur Reduktion des Enzyms nur ein Zehntel der angegebenen NADH-Konzentration verwendet, um die Randabsorption des NADH bei 409 nm zu minimalisieren.

Die Bestimmung der Hämkonzentration erfolgte in Gegenwart von 0,1 % (w/v) NaOH und 10 % Pyridin (v/v) als dithionit-reduziertes Pyridinhämochromogen gegen oxidiertes Pyridinhämochromogen ($\varepsilon_{557-575}$ = 32,4 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (9)). Bei der Bestimmung von freiem Häm wurde der Extinktionskoeffizient von Paul (102) benutzt; $\varepsilon_{557-540}$ = 34,7 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$. Die Aktivität der Cytochrom P450-Reduktase wurde durch die Abnahme der Absorption von Dichlorphenolindophenol bei 600 nm (ε_{600} = 21 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$) nach Masters (103) bestimmt.

Die Aktivität der Cytochrom b_5-Reduktase wurde mit Dichlorphenolindophenol als Elektronenakzeptor und NADH als Elektronendonator in Anlehnung an die Methoden von Savagne (104) und Panfili (105) bestimmt: zu 1 ml 0,3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 0,1 mM an EDTA und 0,96 µM an Dichlorphenolindophenol, wurden 1 - 3 µl Mikrosomensuspension (ca. 2 mg Protein/ml) pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 2 mM Lösung von NADH gestartet. Aus der linearen Absorptionsabnahme bei 600 nm wurde die Aktivität mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des oxidierten Dichlorphenolindophenol, ε_{600} = 21 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (103) berechnet.

2.9 Aktivitätsbestimmung der Glucose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9)

Die Aktivitätsbestimmung der Glucose-6-Phosphatase erfolgte nach der Methode von Baginski (106) durch die Bestimmung des freigesetzten Phosphats mit Ammoniummolybdat. Die Methode ist zeitlich aufwendig und erwies sich auch labortechnisch durch die Verwendung phosphathaltiger Reinigungsmittel als störanfällig. Im Laufe dieser Untersuchung wurde daher eine neue enzymatische Methode zur kontinuierlichen Bestimmung enzymatisch freigesetzten Phosphats entwickelt (Abb. 8). In einer Hilfsreaktion wurde das Phosphat unter Spaltung der N-glycosidischen Bindung des Inosins durch die Nucleosid-Phosphorylase an den Riboseanteil gebunden unter Freisetzung einer equimolaren Menge Hypoxanthin. Dieses wurde durch die Xanthinoxidase

zur Harnsäure oxidiert, deren Bildung kontinuierlich spektrophotometrisch gemessen werden kann (ε_{293} = 12,6 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (107)).

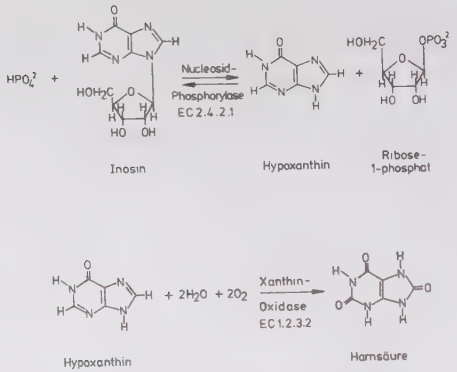


Abb. 8: Schema der enzymatischen Phosphatbestimmung

Die experimentellen Bedingungen wurden so gewählt, daß die zu bestimmende Reaktion geschwindigkeitsbestimmend war. Die Verunreinigungen der Nucleosid-Phosphorylase und der Xanthinoxidase durch Phosphat wurden durch Dialyse gegen KCl/Tris-Puffer (104 mM/50 mM, pH 7,4) entfernt.

Der Reaktionsansatz enthielt in KCl/Kacodylatpuffer (104 mM/25 mM, pH 6,5) 2 mM Inosin, 200 U/l Nucleosid-Phosphorylase, 20 U/l Xanthinoxidase, 6 mM Glucose-6-phosphat (0,4 mM Mannose-6-phosphat) und 10 - 20 mg mikrosomales Protein/l. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 37°C aus der nach ca. 1 - 2 min erreichten linearen Absorptionsänderung.
Die Aktivierung des mikrosomalen Enzyms erfolgte durch Zugabe eines gleichen Volumenanteils von 0,2 % (w/v) des Detergens Brij 58 zu der Mikrosomensuspension (1-2 mg Protein/ml) während 30 min bei 0°C.

2.10 Aktivitätsbestimmung der mikrosomalen Nucleosiddiphosphatase (EC 3.6.1.6)

Das zur Aktivitätsbestimmung der Nucleosiddiphosphatase verwendete Substrat, Inosin-5-diphosphat (IDP), wurde durch Ionenaustauschchromatographie an Sephadex DEAE 50 von Phosphat befreit. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte analog der enzymatischen Bestimmung der Glucose-6-Phosphataseaktivität. Abweichend davon wurde KCl/Tris-Puffer (104 mM/50 mM, pH 7,4) verwendet. Die IDP-Konzentration im Versuchsansatz war 0,4 mM. Die Solubilisierung des Enzyms erfolgte wie in 2.9 angegeben.

2.11 Aktivitätsbestimmung der UDP-Glucuronyltransferase (EC 2.4.1.17)

Die Aktivität des Enzyms wurde nach Bock (108) mit Uridin-5'-diphosphoglucuronat (3,5 mM) und p-Nitrophenol (0,7 mM) als Substrate in KCl/Tris/$MgCl_2$-Puffer (104 mM/25 mM/6 mM, pH 7,4) bestimmt. Die Abnahme des Nitrophenolats wurde bei 440 nm photometrisch ermittelt (ε_{440} = 15,5 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). Die Solubilisierung des Enzyms erfolgte wie in 2.9 angegeben.

2.12 Bestimmung der in vitro Proteinsyntheserate

Die mikrosomale Proteinsyntheserate wurde durch den Einbau von 1-^{14}C-Leucin in mikrosomal gebildete Proteine nach Smuckler (109) bestimmt. Der Inkubationsansatz enthielt pro ml 0,84 - 1,2 mg Protein des postmikrosomalen Überstands und 0,3 - 0,42 mg mikrosomales Protein. Unter diesen Bedingungen war die 1-^{14}C-Leucineinbaurate der mikrosomalen Proteinkonzentration direkt proportional, in Übereinstimmung mit Richter (110).

2.13 Bestimmung der Lipidperoxidation

Lipidperoxidationsprodukte wurden nach Fällung der Proteine durch 0,75 M Trichloressigsäure im Überstand durch eine Farbreaktion mit Thiobarbitursäure nach Reiner (47) bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration wurde der Extinktionskoeffizient des Produkts aus Malondialdehyd und Thiobarbitursäure verwendet, $\varepsilon_{535} = 156 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$.

2.14 Bestimmung der Diene

Die Bestimmung der konjugierten Diene in mikrosomalen Lipiden wurde in Anlehnung an aufwendigere Literaturmethoden (72,73,111) vereinfacht: 1 ml Mikrosomensuspension (1 - 2 mg Protein/ml) wurden mit 10 ml $CHCl_3$/MeOH (2:1, v/v) intensiv gemischt und bei 25000 g 10 min zentrifugiert. Die obere Phase und die Zwischenschicht wurden abgesaugt. 5.0 ml der unteren Phase wurden einrotiert, 5,0 ml $CHCl_3$/MeOH zugegeben und zur Entfernung von Wasser abrotiert. Der Rückstand wurde in 5,0 ml $CHCl_3$/MeOH (2:1, v/v) aufgenommen und die Absorptionsdifferenz zwischen 243 und 220 nm UV-spektrometrisch bestimmt und auf mg mikrosomales Protein bezogen.

2.15 Bestimmung der O_2-Konzentration und Konstanthaltung der O_2-Konzentration

Die O_2-Konzentration wurde polarographisch mit einer O_2-Elektrode (Eschweiler, Typ TT-1-AC(S)) in Verbindung mit einem Nanoamperemeter (Knick, Typ N23) bestimmt. Die Eichung erfolgte mit 0,24 M Natriumsulfit (Nullpunkt) und luftgesättigtem Wasser (0,295 mM O_2, 25° C, (112)). Die untere Nachweisgrenze betrug ca. 1 µM O_2.

Die O_2-Bestimmung im submikromolaren Bereich erfolgte nach Chance (113) durch die O_2-abhängige Lumineszenz des Photobakteriums Vibrio fischeri. Das Meßgefäß befand sich direkt vor dem Photomultiplier eines umgebauten Fluorimeters (Baird-

Atomic, SF 100). Die Kalibrierung erfolgte durch Messung der Fluoreszenz (λ_{max} = 470 nm) nach Zugabe definierter Volumina luftgesättigten Wassers (0,27 mM O_2, 22° C) zu der durch die Bakterien (1 g Feuchtgewicht/l) anaerobisierten Meßlösung. Die unterste Nachweisgrenze lag bei ca. 1 nM O_2.
Bei pO_2-Stat-Versuchen wurde der O_2-Verbrauch in der Meßlösung durch entsprechende Zugabe von O_2-gesättigter Lösung automatisch ausgeglichen. Die verwendete Apparatur bestand aus einer handelsüblichen pH-Stat-Apparatur(Metrohm, pH-Meter E580, Impulsomat E473, Dosimat E535). Anstelle einer pH-Elektrode wurde die polarographische O_2-Meßapparatur (s.o.) verwendet, bei der das Nanoamperemeter als Strom-Spannungswandler diente.

2.16 Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von mikrosomalen Enzymen erfolgte nach Lämmli (114) und die Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine mit Eichproteinen nach Weber und Osborne (115).
Die Trennung der in Gegenwart von SDS und Glycerin solubilisierten Proteine (3 min, 95° C) erfolgte in Rundgelen (Durchmesser 7 mm, Länge 10 cm). Die aufgetrennten Proteine wurden nach Fixierung mit Trichloessigsäure mit Commassie-Brilliantblau gefärbt und nach Stehenlassen in verdünnter Essigsäure das Pherogramm bei 550 nm aufgenommen. Die Radioaktivität in den Proteinbanden wurde nach Zerschneiden des Gels in 1 - 2 mm breite Scheibchen durch Flüssigkeitsszintillation bestimmt.

2.17 Inkubationen

Die Inkubationsgefäße (5-40 ml Inhalt) waren mit einem Glasmantel zur Thermostatisierung, einer O_2-Elektrode, einem magnetischen Rührer und einem doppelt durchbohrten

Teflonverschluß mit Hamiltonmikrohähnen zur Gasführung und zur Zugabe von Lösungen versehen. Das Glasgefäß für die Versuche mit Photobakterien besaß keine O_2-Elektrode, aber zusätzlich einen Seitenarm.
Die Inkubationsansätze enthielten, falls nicht besonders erwähnt, in ihrer Endkonzentration KCl/Tris-Puffer (104 mM, 50 mM, pH 7,4), Mikrosomen (1 - 2 g Protein/l) und Natriumdithionit (1 mM) oder ein NADPH-regenerierendes System. Im Falle der Inkubationen, bei denen phosphatfreisetzende Enzyme bestimmt wurden, das Isocitratsystem, $MgCl_2$ (6 mM), NADP (0,5 mM), Isocitrat (6 mM) und Isocitratdehydrogenase (100 U/l); ansonsten das Glucose-6-phosphatsystem, $MgCl_2$ (6 mM), NADP (0,5 mM), Glucose-6-phosphat (8 mM) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase. CCl_4 (1 mM) wurde in Ethanol (5 mM) gelöst zugegeben, Vergleichsinkubationsansätze enthielten nur Ethanol (5 mM).

Aerobe Inkubationen wurden durch Zugabe von NADP-Lösung gestartet und das Gefäß verschlossen. Bei pO_2-Stat-Versuchen wurde der O_2-gesättigte Puffer durch den Gaseinlaß direkt über den Magnetrührer geführt und überschüssige Lösung aus dem Gasauslaß herausgedrückt.

Anaerobe Inkubationen wurden wie folgt ausgeführt. Die Mikrosomen wurden in einem separaten Gefäß durch Aufblasen von Argon (O_2-Gehalt $\leqslant$ 0,1 ppm) während mindestens 30 min anaerobisiert. Die restlichen Komponenten wurden im Inkubationsgefäß durch Durchblasen von Argon anaerobisiert bis der Nullwert der O_2-Elektrode erreicht war. Bei Versuchen mit Dithionit wurde dann Dithionitlösung zugegeben. Danach wurde die anaerobe Mikrosomensuspension mit einer gasdichten Hamiltonspritze in das Inkubationsgefäß transferiert und die Reaktion nach Temperaturausgleich durch Zugabe von (teil)anaeroben CCl_4 in Ethanol gestartet.
Bei den Versuchen in Gegenwart von Photobakterien (22 mg Feuchtgewicht/l Inkubationslösung) wurde nach Anaerobisierung mit Argon CCl_4 zugegeben und die Reaktion durch

Zusetzen von festem NADP aus dem Seitenarm gestartet.

Die Inkubation von freiem Protohäm wurde analog zu anaeroben Inkubationen mit Mikrosomen und Dithionit durchgeführt. Die Endkonzentrationen waren für Protohäm 0,225 mM, Dithionit 0,450 mM, CCl_4 0,450 mM, Ethanol 2,25 mM und für Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4.

2.18 Hämisolierung

Männliche Ratten werden mit PB vorbehandelt (3 Tage 0,2 % PB im Trinkwasser). 12 Stunden nach Futterentzug wurde 1 ml CCl_4/kg in Olivenöl i.p. appliziert und nach 2 h die Mikrosomen isoliert (2.3). Die Mikrosomensedimente aus 4 Lebern wurden vereint und dreimal mit je 50 ml Pyridin/Wasser (2:1, v/v) versetzt, mit einem Messerhomogenisator gemischt und 10 min bei 30000 g resedimentiert. Die dekantierten Überstände wurden vereint und auf wenige ml eingeengt. Die Reinigung erfolgte durch präparative DC (Fließmittel: 88 ml $CHCl_3$/MeOH (2:1,v/v) und 12 ml Eisessig/Wasser (2:1, v/v)). Die Hämbande wurde mit Pyridin/Wasser (2:1, v/v) eluiert, das Eluat eingeengt und das Häm getrocknet.

Aus Mikrosomen von anaeroben Inkubationen mit CCl_4 wurde nach Zentrifugation (10 min 30000 g) das Häm aus dem Sediment in derselben Weise isoliert.

Die Isolierung des Häm aus Inkubationen mit freiem Protohäm und CCl_4 erfolgte durch Fällung bei pH 2 mit Salzsäure. Das Häm wurde wie oben angegeben durch präparative DC vorgereinigt.

2.19 Eisenfreisetzung aus Häm, Extraktion und Veresterung von Porphyrin

Die Eisenfreisetzung aus Häm und Häm-CCl_4-Produkten (ca. 0,1 µM) erfolgte unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Bathophenanthrolinsulfonsäure (10 µM) und Dithionit

(5 µM) in HCl-gesättigtem Eisessig (10 ml) während 15 min unter Rückfluß. Anschließend wurde die Lösung auf das 4-fache Volumen Eiswasser gegeben und das pH durch Zugabe von festem Natriumcarbonat auf pH 6 gestellt. Die Porphyrine wurden mit Ethylmethylketon extrahiert. Die neutral gewaschene Ketonlösung wurde einrotiert und der Rückstand getrocknet.

Die Veresterung der Porphyrine erfolgte unter anaeroben Bedingungen in HCl-gesättigtem Methanol über Nacht bei Raumtemperatur. Das Methanol wurde abrotiert, der Rückstand in $CHCl_3$ aufgenommen und mit 2 N Natriumcarbonat und mit Wasser neutral gewaschen. Die Auftrennung der Porphyrine erfolgte durch analytische DC.

3 Resultate und Diskussion

3.1 Orientierende Messungen zu in vivo Versuchen

Die Resultate tierexperimenteller Untersuchungen sind von vielfältigen Faktoren abhängig. Diese betreffen die Spezies und den Stamm, das Alter und das Geschlecht, die Ernährung und den Ernährungszustand der Tiere. Bei toxikologischen Versuchen sind die Ergebnisse zusätzlich von der Dosis, der Applikationsform und der Applikationsdauer der giftigen Verbindung abhängig. Der Vergleich experimenteller Daten verschiedener Laboratorien ist daher nur bedingt möglich. Es ist also sinnvoll, unter den gegebenen örtlichen Bedingungen und der gewählten experimentellen CCl_4-Dosis orientierende Messungen auszuführen.

In dieser Arbeit wurden nur geschlechtsreife Wistar-Ratten (Gewicht>150 g) verwendet, denen 12 h vor intraperitonealer CCl_4-Applikation das Futter entzogen wurde. Die Applikationsdauer betrug in der Regel nicht mehr als 2 h. Die gewählte Standarddosis von 1 ml (10,4 mMol) CCl_4/kg ist ein Kompromiß zwischen letaler und subnekrotischer Dosis. Die toxische Dosis von 1 ml CCl_4/kg beträgt 20 % der LD_{95} (116), 50 % der LD_{50} (111), das 12,5-fache der Dosis, die nach 24 h eine noch nachweisbare Nekrose bewirkt (61), und das 125-fache der Dosis, bei der nach 1 h noch eine Schädigung der Glucose-6-Phosphatase nachweisbar ist (61).

3.1.1 Zeitabhängigkeit des CCl_4-Gehalts der Leber

Um einen ersten Einblick in in vivo Verhältnisse bei einer Dosis von 1 ml CCl_4/kg zu gewinnen, wurde die Zeitabhängigkeit des CCl_4-Gehalts der Leber bestimmt (Tab. 1). Der Anstieg des CCl_4-Gehalts der Leber erfolgt schnell, nach 1 h wird der Maximalwert von 2,4 µMol/g erreicht, der Abfall des Gehalts hingegen ist mit $t_{1/2}$ = 4,6 h langsam. Analoge Ergebnisse sind für höhere Dosen bei peroraler Gabe bei männlichen Ratten beschrieben (118-120). Bei der LD_{95}-Dosis wird in der Leber nach 1-3 h ein maximaler CCl_4-Gehalt von 16,5 µMol/g erreicht, die Abnahme des CCl_4-Gehalts erfolgt

dann mit einer Halbwertszeit von ca. 6 h (120). Der maximale CCl_4-Gehalt von 2,4 µMol CCl_4/g Leber entspricht einem ca. 100-fachen molaren Überschuß an CCl_4 in bezug auf Cytochrom P450. Bei einem molaren Verhältnis von CCl_4/Cytochrom P450 ≈ 100/1 ergibt sich auch die in vitro an Mikrosomen bestimmte spektrale Dissoziationskonstante K_s (CCl_4) = 0,5 mM (86) für das oxidierte Cytochrom P450. Dies zeigt, daß in vivo bei einer toxischen Dosis von 1 ml CCl_4/kg eine CCl_4-Konzentration erreicht wird, die bereits zu einer ausreichenden Bindung an das oxidierte Cytochrom P450 führt. Die Beobachtung, daß sich bereits nach 0,5 h nach CCl_4-Gabe in dem Toluol/Methanol-Extrakt 0,07 % der Dosis kovalent gebundenes CCl_4 befindet und sich dieser Anteil danach nicht mehr wesentlich ändert, ist eine Bestätigung, daß die Kovalentbindung von CCl_4-Metaboliten hauptsächlich in der frühen Phase der CCl_4-Vergiftung erfolgt (121).

Tabelle 1
Zeitabhängigkeit des CCl_4-Gehalts der Leber

Zeit nach CCl_4-Gabe (h)	CCl_4-Gehalt der Leber		
	% der Dosis	µMol/kg Tier	µMol/g Leber
0,5	0,51 ± 0,09	48,1	1,56 ± 0,26
1,0	0,73 ± 0,08	68,8	2,38 ± 0,27*
2,0	0,60 ± 0,09	56,6	2,02 ± 0,49
4,0	0,45 ± 0,08	42,4	1,50 ± 0,31
6,0	0,33 ± 0,07	31,1	1,10 ± 0,15

Weiblichen, 12 h gehungerten Wistar-Ratten (172 ± 11 g) wurden pro kg 9430 µMol CCl_4, enthaltend 66,7 µCi $^{14}CCl_4$, in 10 ml Olivenöl gelöst i.p. injiziert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die blutfrei perfundierten Lebern mit dem 20-fachen Volumen 4 °C kaltem Toluol/Methanol (1:1, v/v) homogenisiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 15000 g wurde die Radioaktivität des Überstandes bestimmt. Der Überstand enthielt im Mittel 12,3 ± 3,2 % kovalent gebundenes CCl_4.
Der Cytochrom P450-Gehalt betrug 24,7 ± 2,2 nMol/g Feuchtleber, das Lebergewicht 29,2 ± 3,9 g/kg Tier. Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus drei unabhängigen Versuchen.

* Die Abnahme des maximalen CCl_4-Gehalts erfolgte mit einer Halbwertszeit von 4,6 h.

3.1.2 In vivo CCl_4-Kovalentbindung in der Leber, Verteilung auf die Lebersubfraktionen und Variation der CCl_4-Dosis

Der kovalente Einbau von CCl_4-Metabolite in die Leber erfolgt bevorzugt in die mikrosomalen Lipide (57-60). Dies wurde unter den hiesigen Bedingungen nachvollzogen. Dabei wurden zusätzlich die Lipide aller Lebersubfraktionen extrahiert und die Aktivität der jeweiligen Lipidfraktion mit der der extrahierten Fraktion, der Nichtlipidfraktion, verglichen (Tabelle 2).

Im Gegensatz zu (61) zeigt sich, daß in der Gesamtleber (Summe aller Lebersubfraktionen) das Ausmaß der Alkylierung von Nichtlipiden größer ist als das der Lipide. Nur in der Mikrosomenfraktion ist die Alkylierung von Lipiden ausgeprägter als bei den Nichtlipiden. Die mikrosomalen Lipide enthalten die meisten Phospholipide und zeigen die höchste spezifische Alkylierung, in Übereinstimmung mit (61). Mit Ausnahme der Zellkernfraktion, die auch nicht aufgeschlossene Zellen enthält, binden die CCl_4-Metabolite bei 22 % der Gesamtbindung bevorzugt an Mikrosomen. Bemerkenswert ist die Bindung von 18 % im lipidfreien mikrosomalen Überstand, die noch größer ist als die der mikrosomalen Lipide mit 15 % der Gesamtbindung.
Dies zeigt, daß die Metabolisierung des CCl_4 am ER in einem etwa gleichgroßen Ausmaß zur Alkylierung von Lipiden des ER und cytosolischer Bestandteile führt. Dieser neue, interessante Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Aus der spezifischen Alkylierung der mikrosomalen Lipide (2,24 nMol CCl_4/mg, Tab. 2) läßt sich der Alkylierungsgrad der Lipide abschätzen. Bei einem mittleren Molekulargewicht von 800 der Phospholipide, die 85 % (w/w) der mikrosomalen Lipide ausmachen (3), beträgt der Alkylierungsgrad ca. 0,2 %.

Tabelle 2

In vivo CCl_4-Kovalentbindung in der Leber: Verteilung auf die Lebersubfraktionen

Fraktion	CCl_4-Metabolite kovalent gebunden			mg Lipide/	µMol Phosphor/
	nMol in Nichtlipiden/ g Leber	nMol in Lipiden/ g Leber	nMol/ mg Lipid	g Leber	mg Lipid
Homogenat	111 ± 12	78,0 ± 6,5	1,39	56,0 ± 3,5	-----
Zellkerne	41,9 ± 10	39,4 ± 6,3	1,52	26,0 ± 0,8	1,16 ± 0,19
Mitochondrien	16,2 ± 4,4	14,4 ± 3,1	0,94	15,3 ± 0,6	1,00 ± 0,10
Mikrosomen	11,8 ± 1,3	29,4 ± 0,6	2,24	13,1 ± 2,0	1,29 ± 0,25
Überstand	35,6 ± 7,5*	1,56 ± 0,04	0,06	3,9 ± 0,3	0,52 ± 0,03

Weiblichen, 12 h gehungerten Wistar-Ratten (180 ± 30 g) wurden pro kg 1040 µMol CCl_4, enthaltend 75,1 °Ci $^{14}CCl_4$ (7,95 µCi/µMol) in 10 ml Olivenöl gelöst i.p. injiziert. Nach 2 h wurden die blutfrei perfundierten Lebern (29,6 ± 4,8 g/kg Tier) als 20 %iges Homogenat in 0,25 M Saccharose bei 4 °C differentiell zentrifugiert (Sedimente: 5 min 480 g = Zellkernfraktion; 10 min 5900 g = Mitochondrienfraktion; 60 min 105000 g = Mikrosomenfraktion). Weitere experimentelle Einzelheiten sind in Abschnitt 2.5 angegeben.

* 50 % der Radioaktivität des Überstands ist mit Säure fällbar.

Tabelle 3

In vivo CCl_4-Kovalentbindung in der Gesamtleber: Variation der CCl_4-Dosis

Dosis	CCl_4-Kovalentbindung in der Leber			CCl_4-Kovalentbindung in den Leberlipiden			
µMol CCl_4/kg	% der Dosis	µMol/kg Tier	nMol/g Leber	% der Dosis	µMol/kg Tier	nMol/g Leber	nMol/mg Lipid
10,1	1,85 ± 0,13	0,186	6,31	0,54 ± 0,01	0,055	1,84	0,034
114	0,96 ± 0,15	1,09	36,9	0,32 ± 0,03	0,365	12,3	0,226
1040	0,57 ± 0,13	5,93	200	0,25 ± 0,03	2,60	87,8	1,61
9430	0,22 ± 0,02	20,7	700	0,08 ± 0,01	7,50	254	4,66

Die experimentellen Bedingungen entsprechen denen in Tabelle 2. Die Injektionslösungen enthielten in 10 ml jeweils 80,5 µCi $^{14}CCl_4$ (7,95 µCi/µMol). Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus drei unabhängigen Versuchen. Das Lebergewicht betrug 29,6 ± 4,8 g/kg Tier und der Lipidgehalt 54,5 ± 5,7 mg/g Leber. Der Cytochrom P450-Gehalt war 24,8 ± 2,4 nMol/g Feuchtleber.

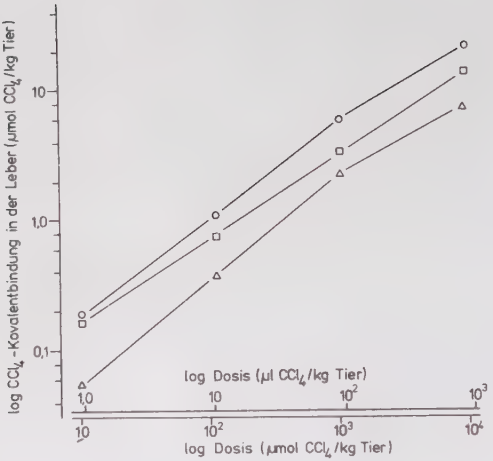


Abb. 9: Abhängigkeit der CCl_4-Kovalentbindung in der Leber von der CCl_4-Dosis (Graphische Darstellung von Tabelle 3)

△ , Bindung an Lipide (Summe der Lipide aller Lebersubfraktionen)

□ , Bindung an Nichtlipide (Summe der Nichtlipide aller Lebersubfraktionen)

○ , Gesamtkovalentbindung (Summe aller Lipid- und Nichtlipidfraktionen

Bei einem mittleren Molekulargewicht von 50000 für mikrosomale Proteine und einem Verhältnis von Protein zu Lipid von 70/30 (%, w/w) (3) und der Voraussetzung, daß die Nichtlipidfraktion der Proteinfraktion entspricht, berechnet sich der Alkylierungsgrad von Proteinen zu ca. 1,9 %. Das Ausmaß der Alkylierung bei der toxischen Dosis von 1 ml CCl_4/kg ist um den Faktor 3 größer.Bei der toxischen Dosis von 1 ml CCl_4/kg werden maximal 0,22 % der Dosis kovalent in der Leber gebunden (Tabelle 3). Das molare Verhältnis von kovalentgebundenen CCl_4-Metaboliten zu Cytochrom P450 berechnet sich zu ca. 30 : 1.
Die Erklärung von Enzymschädigungen durch die Kovalentbindungshypothese erfordert daher die Annahme selektiver, hochspezifischer Alkylierungsmechanismen.

Bei in vivo Versuchen an Mäusen ist die kovalente Bindung von $CHCl_3$-Metaboliten bei einer Dosis von 0,4 ml (5 mMol) $CHCl_3$/kg maximal (123). Ein analoges Bild bei der CCl_4-Intoxikation böte die Möglichkeit, Grenzwerte der Schädigung durch Kovalentbindung zu ermitteln und dann bei höherer Dosis weitere Mechanismen der Schädigung zu studieren. Das Ausmaß der Kovalentbindung von CCl_4-Metaboliten in Abhängigkeit von der CCl_4-Dosis ist in Tabelle 3 und Abbildung 9 wiedergegeben. Ausgehend von der subnekrotischen Dosis (1 µl CCl_4/kg) bis zur toxischen Dosis (ca. 1 ml CCl_4/kg) ist das Ausmaß der Alkylierung jedoch der Dosis direkt proportional. Darüber hinaus zeigt auch die relative Verteilung der Kovalentaktivität zwischen den Lebersubfraktionen und zwischen den entsprechenden Lipid- und Nichtlipidfraktionen keinen von der Dosis abhängigen, signifikanten Unterschied (Daten nicht aufgeführt). In der Gesamtleber ist unabhängig von der Dosis die Alkylierung von Nichtlipiden größer als die der Lipide (Abb. 9); der Anteil der Lipide an der Gesamtkovalentaktivität beträgt $35,5 \pm 6,4$ %.
Das bei der subnekrotischen Dosis ohne Zugabe von CCl_4 ver-

wendete $^{14}CCl_4$ (7,95 µCi/µMol) enthält 12,7 % ^{14}C bei einer radiochemischen Reinheit von 98 %, d.h. 0,26 % radiochemische Verunreinigung. Bei dieser Dosis werden 1,8 % des CCl_4 kovalent gebunden. Die durch Verdünnung mit CCl_4 hergestellte toxische Dosis (ca. 1 ml CCl_4/kg) enthält 2,5 x 10^{-4} % radiochemische Verunreinigung, kovalent gebunden werden aber 0,22 % der Dosis. Dies beweist, daß die Kovalentbindung nicht auf radiochemische Verunreinigungen (z.B. $^{14}COCl_2$) zurückgeführt werden kann. Dies ist neben dem Nachweis der Bildung von ^{14}CO, $^{14}CO_2$ und $^{14}CHCl_3$ aus $^{14}CCl_4$ (1.6) ein weiterer Beweis, daß CCl_4 metabolisiert wird, wenn auch in geringem Maß. Die geringe Metabolisierung des CCl_4 zeigt sich auch darin, daß bei einer Dosis von 1 ml/kg das CCl_4 innerhalb von 18 h zu 85 % wieder ausgeatmet wird (46).

Zusammenfassend zeigt sich:

Bei einer toxischen Dosis von 1 ml CCl_4/kg erreicht der CCl_4-Gehalt der Leber nach 1 h einen Maximalwert von 2,4 µMol/g Leber; das molare Verhältnis von CCl_4 zu Cytochrom P450 beträgt ca. 100 : 1.

Die Kovalentbindung von CCl_4-Metaboliten erfolgt innerhalb von 0,5 h, nach 2 h gemessen sind in den Leberlipiden 0,08 % und in der Gesamtleber 0,22 % der Dosis kovalent gebunden. Etwa 0,6 % der mikrosomalen Lipide und ca. 6 % der mikrosomalen Proteine sind durch CCl_4-Metabolite alkyliert.

Das Ausmaß der CCl_4-Metabolitbindung steigt mit der Dosis im Bereich 1 µl bis 1 ml CCl_4/kg an, und eine Sättigung wird in diesem Bereich nicht erreicht.

Die Kovalentbindungshypothese erfordert die Annahme selektiver, hochspezifischer Alkylierungsmechanismen.

3.2 Einfluß von Caclium und Vitamin D_3 auf die Schädigung mikrosomaler Parameter durch CCl_4

CCl_4 verursacht in vivo eine biphasische Erhöhung des Calciumgehalts der Leber. 30 min nach Applikation von CCl_4 fand Reynolds (124) ein zweifach erhöhtes Lebercalcium, das nach 1 h mit 4-fach erhöhten Werten maximal wird und während der zweiten Stunde wieder den Normalwert erreicht. Nach 8 h steigt der Gehalt der Leber an Calcium erneut an, erreicht nach 40 h mit einem 20-fach erhöhten Wert ein zweites Maximum und nach 72 h wieder den Ausgangswert (125). Schutzfunktionen eines erhöhten Lebercalciums auf die Spätphase und die Zwischenphase der CCl_4-Intoxikation sind beschrieben. So bewirkt die intravenöse Injektion von Calciumgluconat eine histologisch weniger ausgeprägte Nekrose und senkt die CCl_4-bedingte Letalität um 50 % (126). In der Zwischenphase (die Zeit zwischen 2 und 8 h nach CCl_4-Gabe) führt die Vorbehandlung der Tiere mit Vitamin D_3 oder die gleichzeitig mit CCl_4 erfolgte i.p. Applikation von Calciumgluconat zu einem verminderten Austritt von Leberenzymen in das Serum (88). Der Schutzeffekt von Calciumgluconat und Vitamin D_3 ist mit über der Norm liegenden Lebercalciumgehalten verbunden (88). Es ist naheliegend, den Schutzeffekt des Calciumgluconats und des Vitamin D_3 auf die Frühphase der CCl_4-Vergiftung hin zu überprüfen, um Hinweise auf die Art des Schädigungsmechanismus von CCl_4 zu erhalten.

3.2.1 Einfluß des durch Calciumgluconat erhöhten hepatischen Calciumgehalts auf die Schädigung des Cytochrom P450 und der Glucose-6-Phosphatase sowie die Hemmung der Proteinsynthese durch CCl_4 (122)

Zur Messung des Cytochrom P450 ist es notwendig, die Leber blutfrei zu spülen, da Hämoglobin vor allem im Gesamthomogenat bei der spektralen Bestimmung stört. Dazu galt es

eine Methode zu entwickeln, mit der auch der Calciumgehalt des Serums und der Leber an einem Tier bestimmt werden kann. Nach der Punktierung der Aorta erwies sich die retrograde Perfusion der Leber mit Saccharose/Tris-Puffer als geeignet (Abb. 10). Die Perfusion führte zu einem reproduzierbaren ca. 30 %igen Verlust des Lebercalciums. Die Leber enthält pro kg ca. 250 ml Blut und 120 ml interstitielle Flüssigkeit (127a). Bei einem Ca^{2+}-Gehalt von 2,5 mMol/l für Blutplasma und 1,25 mMol/l für die interstitielle Flüssigkeit (127b) berechnet sich der extrazelluläre Ca^{2+}-Gehalt zu ca. 0,5 mMol/kg Leber. Die durch die Perfusion ausgespülten 30 % des Gesamtlebercalciumgehalts (Abb. 10, 11) repräsentieren somit nur einen Teil des extrazellulären Calciums. Bei den mit CCl_4 behandelten Tieren (1 ml CCl_4/kg, 1 h) zeigte sich unabhängig vom Perfusionsvolumen ein konstanter, ca. 4-fach erhöhter Ca^{2+}-Gehalt gegenüber einem 5-fach erhöhten Wert der nicht perfundierten Leber (Abb. 11). Die Abnahme beträgt relativ 30 % des Ausgangswertes und ist absolut 5-mal so hoch wie der perfusionsbedingte Ca^{2+}-Verlust der nicht geschädigten Leber, was zum Teil auf erhöhtes interstitielles Calcium zurückzuführen sein dürfte. Der zeitliche Verlauf der Ca^{2+}-Konzentration in Leber und Serum nach CCl_4-Applikation, sowie die des CCl_4-Gehalts der Leber ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Die Änderungen der Ca^{2+}-Konzentration nach i.p. Gabe von Calciumgluconat zeigt Abbildung 13. Der Ca^{2+}-Gehalt ist gegenüber Vergleichstieren nach 15 min verdoppelt und bleibt während des untersuchten Zeitraums konstant. Die gleichzeitig mit Calciumgluconat und CCl_4 behandelten Tiere weisen 1 h nach der Applikation einen 20-fach erhöhten intrahepatischen Ca^{2+}-Gehalt auf (Tab. 4, Abb. 14.1), wie er nach alleiniger Gabe von CCl_4 erst nach 40 h zu erwarten wäre (125).

Der durch Calciumgluconat erhöhte intrahepatische Ca^{2+}-Gehalt hat weder schützende noch zusätzlich schädigende Wirkung auf die CCl_4-abhängige Konzentrationsabnahme des

Cytochrom P450 und die Aktivitätsabnahme der Glucose-6-Phosphatase (Tab. 4, Abb. 14.2). Die erhöhte Ca^{2+}-Konzentration hat keinen Schutzeffekt auf die CCl_4-bedingte mikrosomale Proteinsynthesehemmung. Der durch CCl_4-Intoxikation um 50 % verminderte in vitro Einbau von Leucin wird bei erhöhtem Lebercalcium um weitere 15 % gehemmt (Tab. 4, Abb. 14.2) Dieser Effekt ist nicht auf experimentelle Bedingungen zurückzuführen. Die entsprechende Erhöhung des Ca^{2+}-Gehalts im Leberhomogenat der Vergleichstiere ergibt keine Änderung der Einbaurate. Insgesamt ist daraus zu schließen, daß die Erhöhung des Calciumgehalts der Leber selbst auf ein pathologisches Niveau keinen wesentlichen Einfluß auf die Primärereignisse der CCl_4-Toxicität am ER hat.
Die Ergebnisse zeigen, daß die endoplasmatische Phospholipase (90) in vivo nicht durch die Erhöhung des Lebercalciums aktiviert wird. Eine Aktivierung hätte eine zusätzliche Schädigung der Glucose-6-Phosphatase und eine zusätzliche Abnahme des Gehalts an Cytochrom P450 bewirken müssen, was nicht der Fall ist. Selbst bei einer Aktivierung der cytosolischen Protease, $K_m(Ca^{2+})$ = 7 µM (89) resultiert keine zusätzliche Schädigung des Cytochrom P450.

Aufgrund der Resultate ist davon auszugehen, daß während der ersten Phase der biphasischen Calciumerhöhung in der Leber keine indirekte, durch Ca^{2+} verursachte Schädigung des ER erfolgt. Die Schädigungen erfolgen demnach durch CCl_4-Metabolite direkt am ER.

3.2.2 CCl_4-Kovalentbindung und Schädigung mikrosomaler Parameter in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem Geschlecht, Schutzeffekt des Vitamin D_3 (139)

Bei konstantem Cytochrom P450-Gehalt ist das Ausmaß der in vivo Kovalentbindung von CCl_4-Metaboliten der CCl_4-Dosis proportional (3.1.2). Die Alkylierung von z.B. Lipiden ist

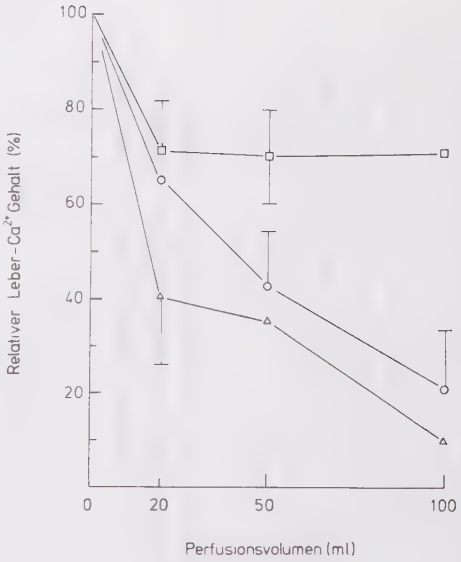


Abb. 10: Einfluß von Art und Volumen des Perfusionsmediums auf den Calciumgehalt in Leberproben

Die Lebern von Normaltieren wurden retrograd mit: □, Saccharose/Tris-Puffer (0,25 M/50 mM, pH 7,4), ○, KCl/Tris-Puffer (0,104 M/50 mM, pH 7,4) oder △, NaCl/Tris-Puffer (0,104M/50 mM, pH 7,4) perfundiert.

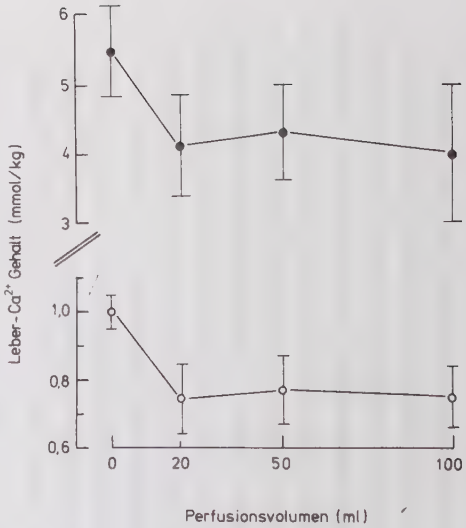


Abb. 11: Einfluß des Perfusionsvolumens auf den intrahepatischen Calciumgehalt von unbehandelten und mit CCl_4 behandelten Tieren

Die Lebern von Normaltieren (○) und mit 1 ml CCl_4/kg 1 h behandelten Tieren (●) wurden mit Saccharose/Tris-Puffer (0,25 M/50 mM, pH 7,4) retrograd perfundiert. Mittelwerte ± s von vier Tieren sind angegeben.

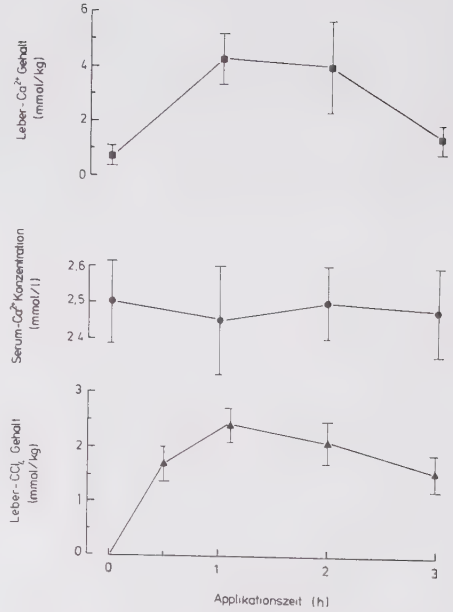


Abb. 12: CCl_4-Gehalt und Calciumspiegel in Leber und Serum nach i.p. Injektion von CCl_4

CCl_4 (1 ml/kg) wurde als 10 %ige (v/v) Lösung in Olivenöl injiziert. Die Bestimmung des CCl_4-Gehalts erfolgte wie in Tab. 1 angegeben. Angegeben sind Mittelwerte ± s von 3 weiblichen Wistar-Ratten.

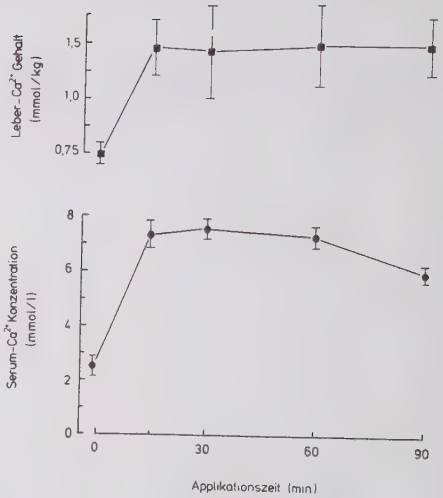


Abb. 13: Calciumspiegel in Leber und Serum nach i.p. Injektion von Calciumgluconat

Calciumgluconat (1 g/kg) wurde als 10 %ige Lösung (v/v) in 1,15 % KCl (w/v) injiziert. Angegeben sind Mittelwerte ± s aus vier unabhängigen Versuchen mit weiblichen Wistar-Ratten.

Tabelle 4

Auswirkungen der Applikation von Calciumglukonat und CCl_4 auf den Calciumgehalt in Serum und Leber, auf mikrosomale Enzyme und die Proteinsynthese.

Behandlung	Calciumgehalt		Cytochrom P450		Glucose-6-Phosphatase	Leucin-einbau
	Serum (mmol/l)	Leber (mmol/kg)	Gesamthomogenat (nmol/g Leber)	Mikrosomen (nmol/mg Prot.)	(U/g Protein)	(Zpmin/mg Prot.)
Na-gluk.	2,56 ±0,03	0,79 ±0,06	24,95 ±3,3	0,68 ±0,06	411,5 ±81,9	3585 ±609
Ca-gluk.	6,92 ±0,91	1,58 ±0,50	26,26 ±1,9	0,71 ±0,07	364,7 ±91,6	3327 ±632
Na-gluk. + CCl_4	2,50 ±0,09	4,58 ±1,18	14,94 ±0,8	0,44 ±0,03	169,8 ±20,8	1596 ±240
Ca-gluk. + CCl_4	6,48 ±0,61	14,27 ±0,83	10,15 ±1,3*	0,48 ±0,02	170,9 ±21,6	1089 ±154

* Die Cytochrom P450-Bestimmung im Gesamthomogenat wird durch die hohe Ca^{2+}-Konzentration beeinflußt. Die Zugabe entsprechender Mengen Ca^{2+} zu den Homogenaten der Vergleichstiere ergibt die selben Werte.

Weibliche Wistar-Ratten erhielten i.p. 1 ml CCl_4/kg als 10 %ige (v/v) Lösung in Olivenoel und und 1 g Gluconat/kg als 10 %ige (w/v) Lösung in 1,15 % (w/v) KCl gleichzeitig 1 h vor Entnahme von Blut und Leber. Vergleichstiere erhielten statt Calciumgluconat Natriumgluconat. Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus vier unabhängigen Versuchen.

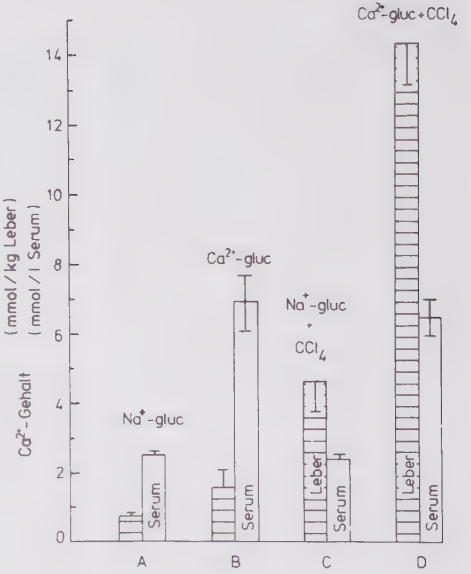


Abb. 14.1

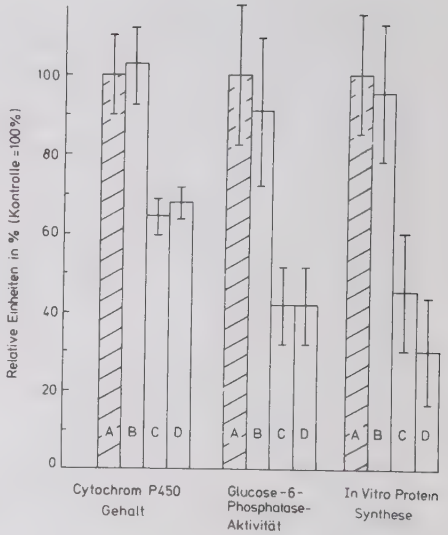


Abb. 14.2

Abb. 14: Auswirkung der Applikation von Calciumgluconat und CCl_4 auf den Ca^{2+}-Gehalt in Serum und Leber (Abb. 14.1) und auf mikrosomale Enzyme sowie die in vitro Proteinsynthese (Abb. 14.2)
Weiblichen, 12 h gehungerten Wistar-Ratten (175 $\pm$ 30 g) wurden i.p. 10 ml/kg folgender 10 %iger Lösungen injiziert:
A, Natriumgluconat; B, Calciumgluconat; C, Natriuumgluconat und CCl_4; D, Calciumgluconat und CCl_4. Die Gluconate wurden in 1,15 % KCl (w/v) und CCl_4 in Olivenöl (v/v) gelöst. 1 h nach Applikation der Lösungen wurde die Aorta punktiert und nachfolgend die Leber retrograd mit Saccharose/Tris-Puffer (250 mM/50 mM, pH 7,4) bei einem Druck von 40 cm Wassersäule perfundiert.

daher ein indirektes Maß der CCl_4-Metabolisierung. Bei konstanter toxischer Dosis wurde in diesen Versuchen der Cytochrom P450-Gehalt der Tiere variiert. Dieses wurde durch Induktion der Cytochrome bei weiblichen Tieren mit 3-MC und PB erreicht. Neben nicht vorbehandelten weiblichen Tieren wurden auch männliche Tiere verwendet, die hormonell bedingt einen höheren Cytochrom P450-Gehalt als weibliche Tiere besitzen (127). Mit Vitamin D_3 vorbehandelte weibliche Tiere wurden zur Untersuchung des vermuteten Schutzeffektes benutzt. Der Gesamt- und Phospholipidgehalt der Leber ist unabhängig von der Vorbehandlung der Versuchstiergruppen 1 h nach CCl_4-Gabe innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen gleich (Tab. 5). Die Phospholipide jeder Tiergruppe sind höher alkyliert als die Gesamtlipide. Abhängig von der Vorbehandlung werden zwischen 0,06 und 0,12 % der CCl_4-Dosis kovalent an die Leberlipide gebunden. Die anderen mikrosomalen Parameter und deren Veränderung 1 h nach CCl_4-Gabe sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die wichtigsten Daten sind in der Abbildung 15 verdeutlicht. Als erstes zeigt sich, daß die absolute Schädigung des Cytochrom P450 mit dem zunehmenden Gehalt dieses Enzyms vor CCl_4-Applikation in erster Näherung korreliert. Das Ausmaß der Lipidalkylierung zeigt hingegen keine Korrelation in bezug auf den Ausgangsgehalt des Cytochrom P450 oder die Cytochrom P450-Schädigung. Erklärbar ist die Diskrepanz zwischen unbehandelten und 3-MC-vorbehandelten weiblichen Tieren. 3-MC induziert Cytochrom P448, das vorwiegend Typ II-Substrate metabolisiert. Typ I-Substrate, wie CCl_4 (86), werden von Cytochrom P448 nicht oder nur langsam umgesetzt (128). Die absolute Schädigung des Cytochrom P450 und das Ausmaß der Metabolisierung des CCl_4 durch 3-MC-vorbehandelte Tiere ist daher gleich der nicht vorbehandelten Vergleichstiergruppe. Erklärbar ist auch das Ergebnis bei männlichen Tieren. Der physiologisch höhere Cytochrom P450-Gehalt bewirkt im Vergleich zu nicht vorbe-

handelten weiblichen Tieren eine vermehrte Metabolisierung verbunden mit einer absolut größeren aber relativ vergleichbaren Abnahme des Gehalts an Cytochrom P450.

Somit gilt es, die Diskrepanz zwischen Vitamin D_3-vorbehandelten Tieren (kleine, statistisch nicht signifikante Schädigung des Cytochroms bei großer Metabolisierungsrate) und PB-vorbehandelten Tieren (ausgeprägte Schädigung des Cytochroms bei relativ kleiner Metabolisierungsrate) zu klären. Dabei ist davon auszugehen, daß die Vitamin D_3-Vorbehandlung keine neuen Cytochrom P450-Formen induziert, da sich der Cytochrom P450-Gehalt durch die Vorbehandlung nur unwesentlich verändert. Nach heutigem Wissen gibt es zur Deutung der Diskrepanz keine einheitliche Erklärung. Man kann lediglich für beide Tiergruppen getrennte Hypothesen aufstellen. Für die exzessive Schädigung des Cytochrom P450 bei PB-vorbehandelten Ratten wäre ein zusätzlicher Schädigungsmechanismus zu postulieren, sei er nun peroxidativer oder suizidaler Natur. Ein suizidaler Schädigungsmechanismus beinhaltet die Bildung von CCl_4-Metaboliten durch das Enzym, die nachfolgend das Enzym durch kovalente Bindung an dessen Aktivzentrum oder dessen Proteinanteil inaktivieren. Für die Effekte des Vitamin D_3 gibt es eine plausible Erklärung: Das Vitamin wird durch Cytochrom P450 an C_{25} hydroxyliert (129). Das Produkt, ein hochaffines Typ I-Substrat (K_s = 80 nM, (130)) könnte durch Bindung an der Substratbindungsstelle vor einer suizidalen oder peroxidativen Schädigung schützen, aber die Metabolisierung des CCl_4 an der 6. Koordinationsstelle des Häms noch ermöglichen.

Quintessenz ist, daß die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten als indirekter Maßstab der Metabolisierung in vivo nicht mit der Schädigung des Cytochrom P450 korreliert. Die Schädigung dieses Enzyms ist anscheinend eher eine Frage der Qualität als der Quantität der Metaboliten. Neben der Membranänderung durch Alkylierung müssen zur Erklärung der Schä-

Tabelle 5

In vivo CCl_4-Kovalentbindung an Leberlipide in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem Geschlecht der Ratten

Geschlecht, Vorbehandlung	Gesamtlipide (mg/g Leber)	Phospholipide (mg/g Leber)	^{14}C-Aktivität Gesamtlipide (dpm/100 mg Lipide)	^{14}C-Aktivität Phospholipide# (dpm/100 mg Lipide)
weiblich, (Kontrolle)	43,3 ± 3,3	19,9 ± 2,2	6729 ± 1503	8736 ± 1595
weiblich, Phenobarbital	42,8 ± 3,2	22,7 ± 2,9	9467 ± 2577*	11977 ± 2794
weiblich, 3-Methylcholanth.	42,7 ± 1,7	19,0 ± 1,9	6705 ± 1359	8444 ± 2571
weiblich, Vitamin D_3	42,5 ± 1,7	18,7 ± 1,1	12247 ± 4018*	15243 ± 3882*
männlich, nicht vorbeh.	43,2 ± 2,3	21,8 ± 2,2	12504 ± 4299*	14835 ± 4922*

*Mit $P < 0,05$ signifikant zur Kontrolle verschieden.

24 h gehungerten weiblichen (207 ± 38 g) und männlichen (305 ± 55 g) Wistar-Ratten wurden pro kg 1 ml CCl_4, bei Kovalenteinbauversuchen mit 69,4 µCi 14-CCl_4 (6,94 µCi/µMol) versetzt, in 10 ml Olivenöl gelöst i.p. injiziert. Die Applikationsdauer betrug 1 h. Vorbehandlung der Tiere: 80 mg Phenobarbital in 5 ml 0,9 % NaCl/kg i.p. während 3 Tagen; 20 mg 3-Methylcholanthren in 5 ml Olivenöl/kg i.p. 48 h und 500000 i.E. Vitamin D_3 in 5 ml Olivenöl/kg oral 72 h vor CCl_4-Applikation.
Die Werte sind Mittelwerte ± s aus mindestens 5 unabhängigen Versuchen.
Die Abtrennung der Phospholipide aus den Gesamtlipiden wurde nach Kates (101) durch Fällung in kaltem Aceton durchgeführt. In den Phospholipidfraktionen fanden sich nach feuchter Veraschung und nachfolgender Phosphatbestimmung 98,8 - 0,4 % des Phosphats der Gesamtlipide.

Tabelle 6

Einfluß der in vivo Applikation von CCl_4 auf mikrosomale Parameter in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem Geschlecht der Ratten (experimentelle Angaben s. Tabelle 5)

Geschlecht		weiblich	weiblich	weiblich	weiblich	männlich
Vorbehandlung		(Kontrolle)	PB	3-MC	Vitamin D_3	
Cytochrom P450	I	24,7 ± 2,2	39,9 ± 4,7*	33,4 ± 6,8*	23,3 ± 6,5	30,3 ± 2,6*
im Homogenat	II	17,6 ± 1,9	21,8 ± 2,6	24,7 ± 4,4	20,7 ± 2,7	19,9 ± 2,3
(nMol/g Leber)	III	-29**	-45**	-26**	-11	-34**
Cytochrom P450	I	9,9 ± 1,0	17,1 ± 3,5*	16,7 ± 3,6*	9,8 ± 3,6	11,8 ± 1,3*
in Mikrosomen	II	3,4 ± 0,9	6,7 ± 1,8	5,9 ± 2,4	4,9 ± 1,8	4,1 ± 0,9
(nMol/g Leber)	III	-66**	-61**	-65**	-50**	-65**
Cytochrom b_5	I	0,45 ± 0,05	0,45 ± 0,09	0,50 ± 0,05	0,37 ± 0,08	0,47 ± 0,07
in Mikrosomen	II	0,26 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,07	0,32 ± 0,05
(nMol/mg Protein)	III	-42**	-15	-35**	-25	-32**
Cytochrom P450-	I	49 ± 7	60 ± 8*	52 ± 9	36 ± 5*	69 ± 14*
Reduktase in Mikr.	II	37 ± 9	50 ± 8	37 ± 10	31 ± 5	45 ± 6
(mU/mg Protein)	III	-24**	-17	-29**	-14	-35**
Cytochrom b_5-	I	302 ± 19	303 ± 79	320 ± 49	267 ± 32*	315 ± 66
Reduktase in Mikr.	II	232 ± 41	268 ± 28	248 ± 28	226 ± 40	255 ± 33
(mU/mg Protein)	III	-23**	-11	-23**	-15	-19
Mikrosomales	I	16,0 ± 2,2	21,6 ± 6,7	18,9 ± 5,4	14,7 ± 2,5	12,0 ± 1,6
Protein	II	12,9 ± 1,2	17,5 ± 2,1	15,8 ± 4,8	15,9 ± 3,5	10,0 ± 1,7
(mg/g Leber)	III	-19	-19	-16	+8	-17

* signifikant mit $P < 0,05$ von der Kontrolle unterschieden

** mit $P < 0,05$ signifikanter Unterschied zwischen I und II

I, Wert ohne CCl_4-Applikation; II, Wert nach 1 h CCl_4-Applikation; III, Differenz zwischen I und II in %

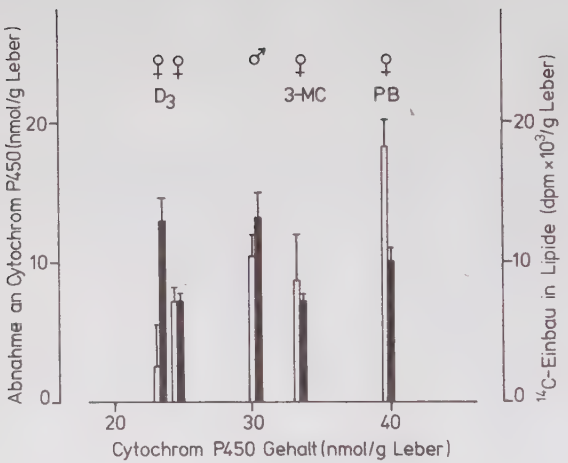


Abb. 15: CCl_4-Kovalentbindung und Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts in Abhängigkeit von dem Cytochrom P450-Gehalt unterschiedlicher Tiergruppen (Graphische Darstellung von Ergebnissen aus den Tabellen 5 und 6)

Helle Säulen (linke Skala): Unterschied zwischen dem Cytochrom P450-Gehalt vor und 1 h nach CCl_4-Applikation.
Dunkle Säulen (rechte Skala): CCl_4-Kovalentbindung in Leberlipide 1 h nach CCl_4-Applikation.
Die Ordinateneinteilung ist so gewählt, daß die beiden Säulen für die nicht vorbehandelte weibliche Vergleichstiergruppe gleich hoch sind. Die Abszisse gibt den Cytochrom P450-Gehalt im Leberhomogenat der Tiergruppen ohne CCl_4-Applikation wieder.

digung des Cytochrom P450 zusätzliche peroxidative oder suizidale Mechanismen angenommen werden.

3.3 Schädigung der Glucose-6-Phosphatase, der Nucleosiddiphosphatase und der UDP-Glucuronyltransferase durch CCl_4

Die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an Lipide ist, wie die bisherigen Untersuchungen am Beispiel des Cytochrom P450 zeigten, nicht ausreichend zur Erklärung der Primärschäden am ER. Zur weiteren Charakterisierung der Schädigungsmechanismen werden Aktivitätsänderungen von endoplasmatischen Enzymen untersucht,die ein sogenanntes Latenzverhalten zeigen. Dieses am Beispiel der Glucose-6-Phosphatase, der UDP-Glucuronyltransferase und der Nucleosiddiphosphatase. Diese Enzyme befinden sich im Gegensatz zu Cytochrom P450, Cytochrom b_5 und deren Reduktasen nicht an der cytosolischen Oberfläche des ER. Sie sind in der Membran lokalisiert oder zum Lumen des ER, bzw. zur Zisternae der Mikrosomen ausgerichtet. Damit sind sie für ihre Substrate von der cytosolischen Seite her nicht frei zugänglich, da die Membran für geladene Moleküle relativ undurchlässig ist (131). Für Glucose-6-phosphat wurde ein mikrosomales Transportsystem nachgewiesen (132) und für UDP-glucuronat postuliert (133). Durch Behandlung mit Detergenzien werden die "latenten" Enzyme aus der Membran herausgelöst, werden für ihre Substrate zugänglicher und damit entsprechend aktiver (3). Eine direkte Schädigung der Enzyme durch CCl_4-Metabolite oder Lipidperoxidationsprodukte muß sich daher durch eine Abnahme der Enzymaktivität im membranfreien, solubilisierten Zustand nachweisen lassen. Eine Aktivitätsänderung im membrangebundenen, nativen Zustand widerspiegelt Änderungen der Membran und/oder des Substrattransportsystems. Eine Differenzierung der CCl_4-Schädigung unter diesem Gesichtspunkt ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Zunächst soll nach in vivo Applikation von CCl_4 geklärt werden, ob die CCl_4-bedingte Schädigung endoplasmatischer En-

zyme durch die Aktivitätsbestimmung der Enzyme im nativen und solubilisierten Zustand zu unterscheiden ist. Danach wird durch in vitro Untersuchungen bestimmt, in welchem Maße die Enzymschädigungen von der O_2-Konznetration abhängig sind.

3.3.1 Schädigung der Enzyme in vivo, Abhängigkeit von der CCl_4-Dosis und der Applikationsdauer

In diesen Versuchen wurden PB-vorbehandelte Ratten verwendet. Die Vorbehandlung mit PB führt zu einer größeren Suszeptilität der Tiere gegenüber CCl_4. Diese betrifft die Schädigung des Cytochrom P450 (3.2.2), die Aktivitätsverminderung der Glucose-6-Phosphatase, die Steigerung des Calciumgehalts der Leber und die morphologische Veränderung des ER (134) sowie die LD_{50}-Dosis, die mit 0,5 ml CCl_4/kg (135) nur noch ein Viertel der LD_{50} nicht vorbehandelter Tiere beträgt.

Die Glucose-6-Phosphatase zeigt im nativen und im solubilisierten Zustand eine vergleichbar verminderte Aktivität (Tab. 7). Dies ist ein Indiz für die direkte Schädigung dieses Enzyms.

Die Nucleosiddiphosphatase hingegen wird bei einer toxischen Dosis von 1 ml CCl_4/kg im nativen Zustand aktiviert; solubilisiert gemessen zeigt sich keine Aktivitätsänderung. Das Enzym wird daher nicht direkt geschädigt. Die Aktivitätserhöhung ist wahrscheinlich auf die erhöhte Permeabilität der Membran für das Substrat zurückzuführen. Bei der kleineren Dosis von 0,1 ml CCl_4/kg, die noch eine nekrotische Wirkung entfaltet (61), zeigt das Enzym keine Aktivitätsänderung.

Bei hoher Dosis (1ml CCl_4/kg) weist die UDP-Glucuronyltransferase nach 2 h eine deutliche Aktivitätssteigerung im nativen Zustand auf, die unter anderen experimentellen Bedingungen auch von Oteri (136) nachgewiesen wurde. Im

solubilisierten Zustand nimmt die Aktivität des Enzyms bei konstanter Applikationszeit (24 h) mit steigender Dosis ab. In Übereinstimmung damit ist nach einmaliger CCl_4-Applikation eine kontinuierliche Abnahme der solubilisierten UDP-Glucuronyltransferaseaktivität beobachtet worden (137). Die Aktivitätsänderung der UDP-Glucuronyltransferase in vivo ist somit auf zwei gegenläufige Effekte zurückzuführen. Neben der Aktivitätserhöhung infolge verbesserter Permeabilität der Membran für das Substrat erfolgt eine direkte Schädigung des Enzyms. Die Effekte kompensieren sich (zufällig) 24 h nach CCl_4-Applikation bei einer Dosis von 1 ml und 0,01 ml CCl_4/kg.
Die Versuche zeigen, daß Enzyme, die nicht Bestandteil des Monooxygenasesystems sind, direkt geschädigt werden können.
Die direkte Schädigung kann, wahrscheinlich infolge einer Permeabilitätserhöhung der Membran für die Substrate, durch Schädigung der Membran zeitweilig überkompensiert werden. Die Aktivitätssteigerung der Nucleosiddiphosphatase ist ein direktes Maß der Membranschädigung durch CCl_4-Metabolismus, da das Enzym selbst nicht geschädigt wird.

3.3.2 Schädigung der Enzyme in vitro unter pO_2-Stat und anaeroben Bedingungen (140,141)

Unter aeroben Bedingungen wird die Glucose-6-Phosphatase in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems auch in Abwesenheit von CCl_4 im nativen und solubilisierten Zustand geschädigt (Abb. 16). Die zusätzliche Präsenz von CCl_4 führt zu einer verstärkten Inaktivierung des Enzyms. Dies ist in Einklang mit einer lipidperoxidativen Schädigung des Enzyms, da CCl_4 die endogene, nur von NADPH-abhängige peroxidative Veränderung der mikrosomalen Membran verstärkt (136).Zusätzlicher Hinweis dazu ist die bereits von mehreren Autoren bestätigte Stabilität des Enzyms un-

Tabelle 7

Relative Änderung mikrosomaler Parameter nach in vivo Applikation von CCl_4 in Abhängigkeit von der Dosis und der Applikationsdauer

Dosis (ml CCl_4/kg)	1,0		0,1	0,01	0,001
Applikationsdauer (h)	2	24	24	24	24
Cytochrom P450-Gehalt	38 ± 5	7 ± 3	43 ± 4	80 ± 2	n.s.
Cytochrom b_5-Gehalt	n.s.	34 ± 5	n.s.	n.s.	n.s.
Häm-Gehalt	60 ± 5	33 ± 4	68 ± 3	85 ± 6	n.s.
Glucose-6-Phosphatase-Aktivität	54 ± 15	15 ± 10	54 ± 8	53 ± 15	n.s.
(solubilisiert)	(74 ± 7)	(16 ± 12)	(68 ± 10)	(60 ± 10)	(n.s.)
Nucleosid-diphosphatase-Aktivität	170 ± 30	130 ± 10	n.s.	n.s.	n.s.
(solubilisiert)	(n.s.)	(n.s.)	(n.s.)	(n.s.)	(n.s.)
UDP-Glucuronyl-transferase-Aktivität	300 ± 60	n.s.	140 ± 20	n.s.	n.s.
(solubilisiert)	(n.s.)	(23 ± 10)	(45 ± 15)	(70 ± 15)	(n.s.)

Phenobarbital-induzierten (3 Tage 0,2 % PB im Trinkwasser) weiblichen Wistar-Ratten (180 ± 25 g) wurden 12 h nach Futterentzug 10 ml/kg einer Lösung von CCl_4 in Olivenöl i.p. injiziert. Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus drei Tiergruppen mit je drei Tieren bezogen auf den Mittelwert = 100 der Vergleichstiergruppe, der Olivenöl ohne CCl_4 injiziert wurde. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (zweiseitiger t-Test, $P \geq 0,05$) der Mittelwerte aus Versuchs- und Kontrolltiergruppen sind mit n.s. bezeichnet.
Die Solubilisierung der Mikrosomen (1 - 2 mg Protein/ml) erfolgte durch die Zugabe eines gleichen Volumenanteils von 0,2 % (w/v) Brij 58 in KCl/Tris-Puffer (104 mM/50 mM, pH 7,4) zu den Mikrosomen und 30 min Stehenlassen bei 0 °C.

ter anaeroben Bedingungen, selbst in Gegenwart von CCl_4 (Abb. 17,(78,137,138)). Nicht ausgeschlossen ist unter aeroben Bedingungen eine Schädigung durch O_2-abhängig gebildete CCl_4-Metabolite, wie $COCl_2$ und $^{\cdot}O_2CCl_3$ (1.8, Abb. 6). Die Bildung von $COCl_2$ über $CHCl_3$ erscheint unwahrscheinlich, da die Zugabe von $CHCl_3$ zu $^{14}CCl_4$ keine Veränderung der Kovalentbindung von ^{14}C-Metaboliten und der Bildung von $^{14}CO_2$ bewirkt (49).

Eine Schädigung der Glucose-6-Phosphatase durch Lipidperoxidation sollte im Bereich des K_m (O_2) = 35 µM der CCl_4-initiierten Peroxidation (81) von der O_2-Konzentration abhängig sein. Die Schädigung des Enzyms bei 8 mmHg O_2 (1 % O_2 = 11 µM O_2 bei 37° C) und bei 80 mmHg (10 % O_2 = 110 µM O_2 bei 37° C) zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Erniedrigung der O_2-Konzentration führt zu keiner wesentlichen Änderung der Lipidperoxidation, gemessen durch die Malondialdehydbildung (142). Demnach kann keine Entscheidung getroffen werden, ob die direkte Schädigung des Enzyms durch Lipidperoxidationsprodukte oder durch O_2-abhängig gebildete CCl_4-Metabolite erfolgt.

Versuche bei kleineren O_2-Konznetrationen konnten unter pO_2-Stat Bedingungen wegen apparativ bedingter, regeltechnischer Schwierigkeiten nicht mit der notwendigen Präzision und Genauigkeit durchgeführt werden.

Die Glucose-6-Phosphatase zeigt, wahrscheinlich infolge des Substrattransportsystems, eine relativ geringe Latenz (Abb. 16). Die im Vergleich dazu große Latenz der UDP-Glucuronyltransferase (Abb. 18) ist Argument gegen ein Transportsystem für UDP-Glucuronat. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die enzymatische Aktivität auch von der Verfügbarkeit des Substrats p-Nitrophenol (pK_a = 7,15 (112)) abhängig ist und diese limitierend sein kann. Die Aktivierung im nativen Zustand und die Deaktivierung im solubilisierten Zustand bestätigen die in vivo Befunde (3.3.1). Die Aktivität des Enzyms ist bei endogener Lipid-

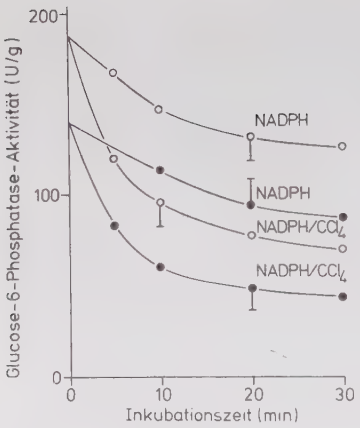


Abbildung 16

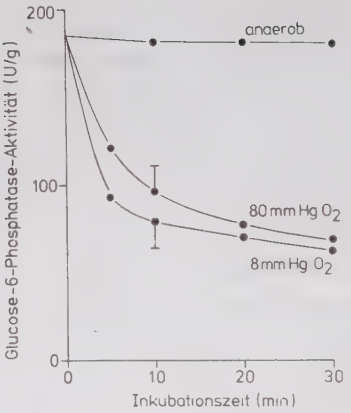


Abbildung 17

Abb. 16: Zeitliche Veränderung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität bei konstanter O_2-Konzentration (80 mmHg)

Mikrosomen PB-vorbehandelter weiblicher Ratten (1,5 mg mikrosomales Protein/ml) wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Isocitratsystems (2.17) bei 37 °C und 80 mmHg (110 µM O_2) in Abwesenheit und Anwesenheit von CCl_4 (1 mM) inkubiert. Der Proteingehalt und die CCl_4-Konzentration sind Mittelwerte, da die Zugabe von O_2-gesättigtem Puffer zur O_2-Konstanthaltung (2.15) eine Verdünnung des Inkubationsansatzes bis zu einem Faktor 1,8 zur Folge hatte. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Bestimmung der Enzymaktivität rechnerisch berücksichtigt. Die Sauerstoffkonzentration vor Inkubationsbeginn wurde durch Aufblasen von Argon auf die Oberfläche der Inkubationslösung eingestellt. Nach Zugabe von CCl_4 wurde die Reaktion durch Einspritzen einer NADP-Lösung gestartet. Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms erfolgte im nativen (●) und im solubilisierten (○) Zustand des Enzyms. Angegeben sind Mittelwerte ± s aus mindestens 3 Inkubationen.

Abb. 17: O_2-Abhängigkeit der zeitlichen Änderung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in Gegenwart von CCl_4

Die Aktivität wurde im solubilisierten Zustand des Enzyms bestimmt. Die O_2-Konzentration bei anaeroben Bedingungen lag unterhalb der Nachweisgrenze der O_2-Elektrode (1 µM O_2). Weitere experimentelle Einzelheiten sind in der Legende zur Abbildung 16 aufgeführt.

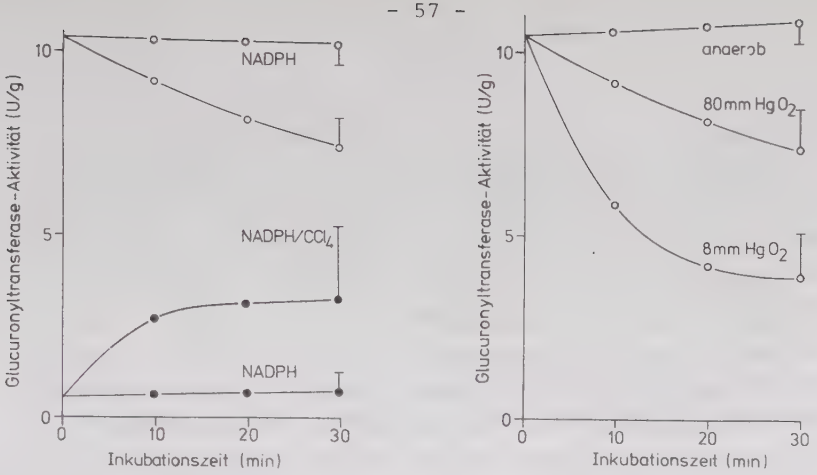


Abb. 18: Zeitliche Veränderung der Glucuronyltransferase-Aktivität bei konstanter O_2-Konzentration (80 mmHg)

Die Aktivität des Enzyms wurde im nativen (●) und im solubilisierten (○) Zustand des Enzyms mit p-Nitrophenol und UDP-glucuronat bestimmt(2.11). Die Inkubationsbedingungen sind in der Legende zu Abb. 16 angegeben.

Abb. 19: O_2-Abhängigkeit der Glucuronyltransferase-Aktivität in Gegenwart von CCl_4

Die Bestimmung der Aktivität des Enzyms erfolgte im solubilisierten Zustand. Experimentelle Einzelheiten entsprechen denen in der Legende zur Abbildung 18.

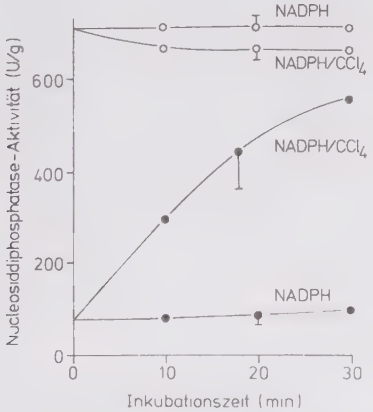


Abb. 20: Zeitliche Veränderung der Nucleosiddiphosphatase-Aktivität bei konstanter O_2-Konzentration (80 mmHg)

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms erfolgte im nativen (●) und im solubilisierten (○) Zustand mit Inosin-5-diphosphat als Substrat (2.10). Die experimentellen Bedingungen entsprechen denen in Abbildung 16.

peroxidation (Abb. 18) und unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von CCl_4 (Abb. 19) unverändert. Bei geringer O_2-Konzentration ist die direkte Schädigung des Enzyms ausgeprägter (Abb. 19). Dies ist durch die Kompetition des reduktiven Metabolismus des CCl_4 mit der O_2-abhängigen CCl_4-initiierten Lipidperoxidation erklärbar.

Zusammenfassend zeigt sich:
Die CCl_4-bedingte Aktivitätsänderung der Glucose-6-Phosphatase, der UDP-Glucuronyltransferase und der Nucleosiddiphosphatase sind notwendig o_2-abhängig.

Die Nucleosiddiphosphatase wird nicht geschädigt, während die Schädigung der Glucose-6-Phosphatase und der UDP-Glucuronyltransferase direkt erfolgt. Eine Entscheidung, ob die direkte Schädigung durch Lipidperoxidationsprodukte oder durch o_2-abhängig gebildete CCl_4-Metabolite erfolgt, kann durch die O_2-Abhängigkeit der Schädigung nicht getroffen werden.

3.4 Schädigung des Cytochrom P450

Nach in vivo Applikation von CCl_4 ist die Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts in den isolierten Mikrosomen mit einer verminderten mikrosomalen Monooxygenaseaktivität verbunden (119,143). Dies gilt auch für in vitro Versuche (136), so daß die Gehaltsabnahme des Cytochrom P450 der Aktivitätsabnahme des Enzyms gleichgesetzt werden kann. Dabei entspricht der Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts eine entsprechende Abnahme des mikrosomalen Häm-Gehalts (144,145). Die Mehrzahl der Publikationen über die Schädigung des Cytochrom P450 in vivo und in vitro beweisen scheinbar, daß der CCl_4-bedingten Abnahme des Enzyms ein peroxidativer Mechanismus zugrunde liegt.

NADPH führt in vitro unter aeroben Bedingungen zu einer endogenen, d.h. von CCl_4 unabhängigen, peroxidativen Schädigung mikrosomaler Lipide. Dabei nimmt der mikrosomale

Gehalt an Cytochrom P450 und dementsprechend der des Häm ab (146). Inhibitoren der Lipidperoxidation, z.B. EDTA, verhindern die Abnahme des Cytochrom P450 und das Häm (146). Die zusätzliche Anwesenheit von Peroxidantien, z.B. Fe^{3+}, die die Lipidperoxidation verstärken, führt sinngemäß auch zu einer größeren Abnahme von mikrosomalem Cytochrom P450 und Häm, die durch Zugabe von Eisenkomplexbildnern (EDTA, Desferrioxamin) verhindert wird (147). In vivo führt die i.p. Applikation von Fe^{3+} ebenfalls zu einer Abnahme des Cytochrom P450 in der Leber. Bei der Abnahme des Cytochrom P450 durch endogene Lipidperoxidation erfolgt eine äquimolare Bildung von CO (148). Die Hämprodukte wurden bisher nicht charakterisiert. Die Reaktion entspricht jedoch der Häm-Oxygenasereaktion, bei der Cytochrom P450 (149) NADPH- und O_2-abhängig 1 Mol Protohäm zu 1 Mol Biliverdin und 1 Mol CO umsetzt (150). Dies läßt vermuten, daß das Protohäm durch Lipidperoxidation aus dem Cytochrom P450 freigesetzt wird und dann durch noch intaktes Cytochrom P450 unter Bildung von Biliverdin und CO monooxygeniert wird.

In vitro verstärkt CCl_4 die Lipidperoxidation, was zu einer entsprechend größeren Schädigung des Cytochrom P450 führt (136,151). Die Gegenwart von EDTA beeinflußt unter aeroben Bedingungen den Metabolismus des CCl_4 nicht, gemessen durch die kovalente Bindung von CCl_4-Metabolite an Mikrosomen, verhindert aber die Lipidperoxidation und die Schädigung des Cytochrom P450 (47,48). Unter anaeroben Bedingungen wird CCl_4 zu $CHCl_3$ metabolisiert und CCl_4-Metabolite binden vermehrt an Lipide und Proteine der Mikrosomen (47,48, 64). In Einklang mit der Lipidperoxidationshypothese fanden Glende und Mitarbeiter (137) zwar unter anaeroben Versuchsbedingungen eine Alkylierung von Mikrosomen durch CCl_4-Metabolite, aber keine Schädigung des Cytochrom P450.

Argumente gegen die Lipidperoxidationshypothese der Cytochrom P450-Schädigung sind nur durch in vivo Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Castro gegeben (70,152-154). Die pro-

phylaktische Behandlung von Ratten mit Antioxidantien (Vit. E, DPPD) vermindert die CCl_4-bedingte,histologisch nachgewiesene Nekrose, nicht aber die Schädigung des Cytochrom P450 (152). Mäuse wie auch Ratten zeigen nach CCl_4-Gabe eine Schädigung des Cytochrom P450, aber keine Bildung von mikrosomalen Lipiddienen als Maßstab der in vivo Lipidperoxidation (153). Im Gegensatz zu Ratten führt die CCl_4-Applikation bei Mäusen auch zu keiner Abnahme des Gehalts ungesättigter mikrosomaler Leberlipide (70); dies ist ein zusätzlicher Hinweis, daß die Lipidperoxidation bei der Schädigung des Cytochrom P450 unwesentlich ist (70). Es sei erwähnt, daß im Gegensatz zu Castro (153) Lee (73) auch bei Mäusen eine CCl_4-bedingte Erhöhung von mikrosomalen Lipiddienen der Leber nachgewiesen hat. Die Arbeitsgruppe von Castro postuliert die Schädigung des Cytochrom P450 im Sinne der Bindungshypothese, ohne jedoch einen direkten Nachweis zu erbringen, daß die CCl_4-Alkylierung des Enzyms eine Schädigung des Cytochrom P450 zur Folge hat.

In den folgenden Abschnitten soll zunächst überprüft werden, welche Bedeutung der Lipidperoxidationshypothese gegenüber der Bindungshypothese bei der Schädigung des Cytochrom P450 zukommt. Da die Lipidperoxidation notwendig O_2-abhängig ist, ist die Bestimmung der O_2-Konzentration im Versuchsansatz wesentlich. Im Gegensatz zur Literatur wurde die O_2-Konzentration während der Versuche direkt gemessen und auch unter extrem anaeroben Bedingungen bestimmt. Die Versuche zeigen, daß die Schädigung des Cytochrom P450 durch CCl_4-Metabolite auch dann erfolgt, wenn lipidperoxidative Prozesse praktisch ausgeschlossen werden können (155,156).

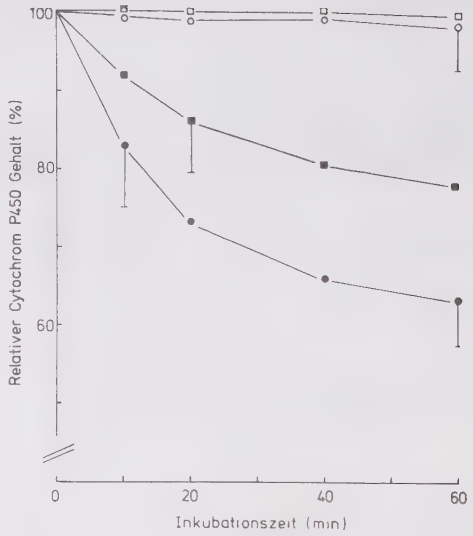


Abbildung 21.1

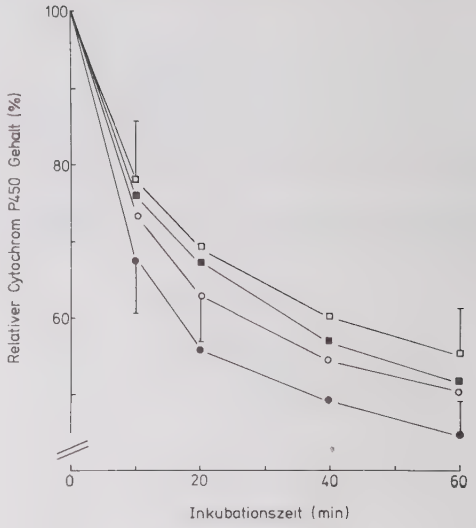


Abbildung 21.2

Abb. 21: Abnahme des mikrosomalen Cytochrom P450-Gehalts in Abwesenheit (Abb. 21.1) und in Gegenwart (Abb. 21.2) von CCl_4

Lebermikrosomen (1,5 g Protein/l) aus nicht vorbehandelten, 12 h gehungerten weiblichen Wistar-Ratten wurden bei 22 °C in Gegenwart des NADPH-regenerierenden Glucose-6-phosphatsystems (2.17) inkubiert. Ethanol (5 mM) wurde allen Ansätzen zugegeben. Die CCl_4-Ausgangskonzentration war 1 mM. Die O_2-Ausgangskonzentration war ca. 0,25 mM bei aeroben Inkubationen und bei anaeroben Inkubationen kleiner als 1 µM. Der Ausgangsgehalt an Cytochrom P450 betrug 1 µM. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ s aus drei Inkubationen. Die Symbole bedeuten: ●, aerob; ○, anaerob; ■, aerob, 1 mM EDTA; □, anaerob, 1 mM EDTA.

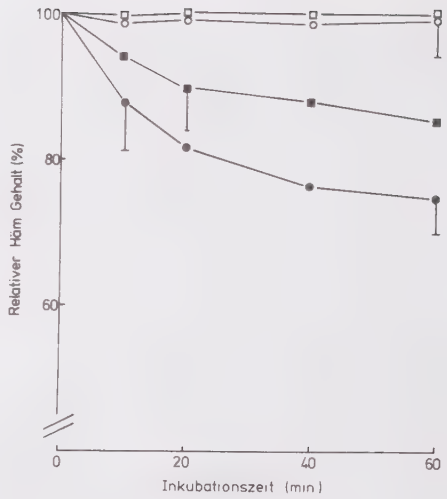


Abbildung 22.1

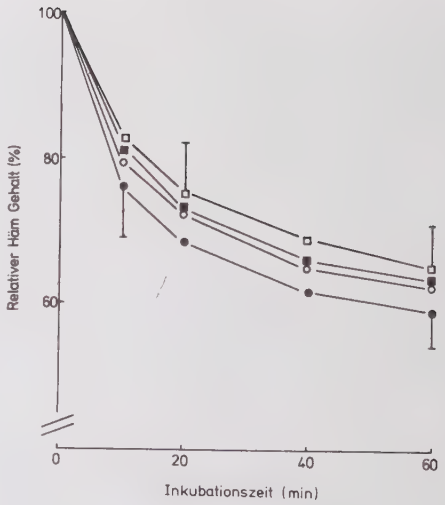


Abbildung 22.2

Abb. 22: Abnahme des mikrosomalen Häm-Gehalts in Abwesenheit (Abb. 22.1) und in Anwesenheit (Abb. 22.2) von CCl_4

Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zur Abbildung 21 angegeben. Der Ausgangsgehalt an Häm war 1,77 µM. Die Symbole bedeuten:
● , aerob; ○ , anaerob; ■ , aerob, 1 mM EDTA; □ , anaerob, 1mM EDTA.

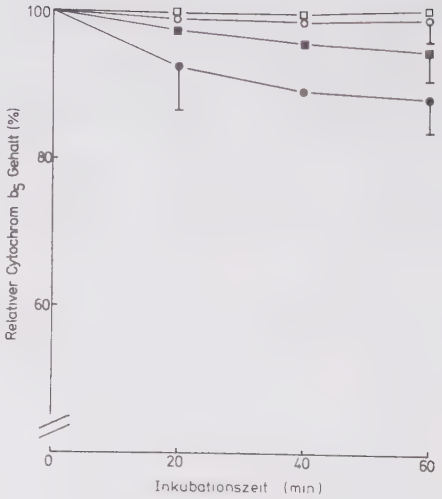


Abbildung 23.1

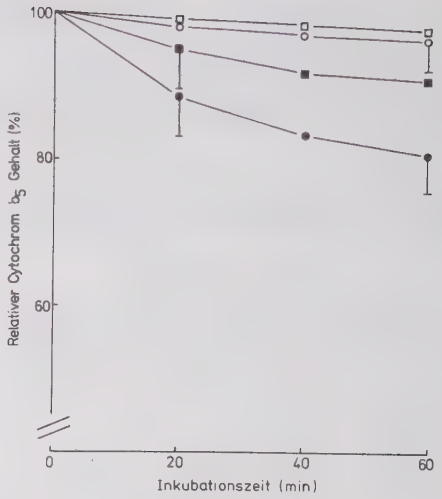


Abbildung 23.2

Abb. 23: Abnahme des mikrosomalen Cytochrom b_5-Gehalts in Abwesenheit (Abb. 23.1) und in Gegenwart (Abb. 23.2) von CCl_4

Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zur Abbildung 21 angegeben. Der Ausgangsgehalt an Cytochrom b_5 war o,66 µM. Die Symbole bedeuten:
● , aerob; ○ , anaerob; ■ , aerob, 1 mM EDTA; □ , anaerob, 1 mM EDTA.

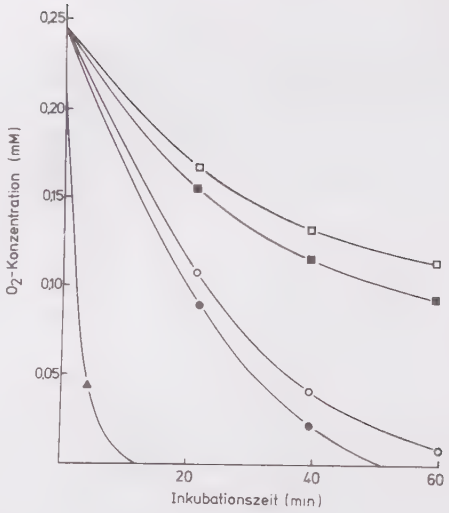


Abb. 24: Abnahme der O_2-Konzentration während aerober Inkubationen von Mikrosomen in Gegenwart von NADPH

Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 21 angegeben. Die Symbole bedeuten: ■ , NADPH; □ , NADPH, 1 mM EDTA; ● , NADPH, 1 mM CCl_4; ○ , NADPH, 1 mM EDTA und 1 mM CCl_4; ▲ , NADPH, 1 mM CCl_4 bei 37 °C. Die Sauerstoffkonzentration wurde kontinuierlich polarographisch bestimmt (2.15).

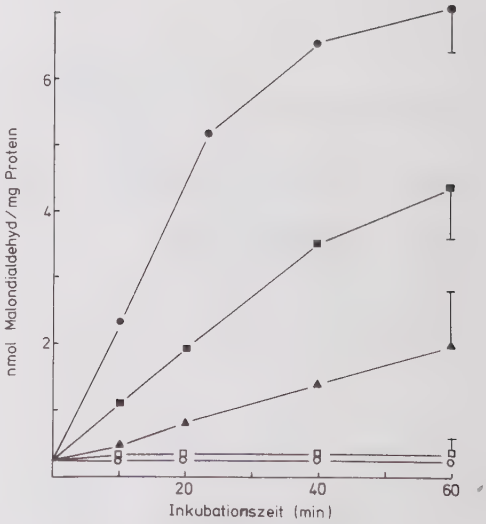


Abb. 25: Bildung von Malondialdehyd während Inkubationen von Mikrosomen in Gegenwart von NADPH

Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 21 angegeben. Der Ausgangsgehalt an Malondialdehyd nicht inkubierter Mikrosomen war 0,35 µM. Die Symbole bedeuten: ■ , NADPH; ● , NADPH, 1 mM CCl_4; □ , NADPH, 1 mM EDTA; ▲ , NADPH, 1 mM EDTA und 1 mM CCl_4; ○ , anaerob 1 mM CCl_4.

3.4.1 Vergleich der Schädigung unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Gegenwart und Abwesenheit von CCl_4, Einfluß von EDTA auf die Schädigung, den O_2-Verbrauch und die Lipidperoxidation

Die Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts ist in Gegenwart von CCl_4 unter allen Versuchsbedingungen größer als bei dessen Abwesenheit (Abb. 21). Die Abnahme des Häm-Gehalts (Abb. 22) verläuft parallel der Abnahme des Cytochrom P450. Die Verminderung des Häm-Gehalts ist im wesentlichen auf die Schädigung des Cytochrom P450 zurückzuführen, da sich der Cytochrom b_5-Gehalt bei allen Inkubationsbedingungen nur wenig ändert (Abb. 23). In Kontrast zu (47,48,137) ist die Schädigung des Cytochrom P450 in Gegenwart von CCl_4 unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu beobachten (Abb. 21.1). Die anderen Autoren verwendeten unter aeroben Bedingungen EDTA (47,48), um die Lipidperoxidation zu hemmen. Glende und Mitarb. (137) setzten EDTA auch bei anaeroben Versuchsbedingungen ein, obwohl durch den Ausschluß von Sauerstoff die Peroxidation von Lipiden per se nicht erfolgen kann. Die Überprüfung des Einflusses von EDTA auf die Schädigung des Cytochrom P450 zeigt, daß EDTA in Gegenwart von CCl_4 weder unter aeroben noch anaeroben Bedingungen einen wesentlichen Schutzeffekt zeigt. In Übereinstimmung mit (136,157) verhindert EDTA die endogene Lipidperoxidation (Abb. 25) vollständig und die CCl_4-initiierte Lipidperoxidation nur teilweise (Abb. 25,136). Unter anaeroben Bedingungen ist wie erwartet keine Lipidperoxidation nachweisbar. Unter aeroben Bedingungen bewirkt die Zugabe von EDTA nur eine geringe Verminderung des O_2-Verbrauchs, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von CCl_4. Durch die Effekte des EDTA können daher die Ergebnisse der anderen Autoren nicht erklärt werden. Dies gilt besonders für die anaeroben und aeroben Versuche mit CCl_4, wo bei vergleichbarer Inaktivierung des Cytotochrom P450 eine drastische Zunahme der Lipidperoxidation unter aeroben Bedingungen zu verzeichnen ist.

Unter der Annahme, daß der Sauerstoffverbrauch während der Inkubation ausschließlich zur Bildung von Lipidperoxiden führt, kann die Empfindlichkeit des Malondialdehydnachweises abgeschätzt werden (Abb. 24 und 25). Die Relation des O_2-Verbrauchs zur Malondialdehydbildung beträgt bei der endogenen Lipidperoxidation ca. 23 : 1 und bei der CCl_4-initiierten Lipidperoxidation ca. 25 : 1. Diese Werte stimmen überraschend gut mit Daten von Slater und Sawyer (158) überein. Die Autoren bestimmten den Quotienten aus den jodometrisch nachweisbaren Lipidperoxiden und den als Malondialdehyd erfaßbaren Lipidperoxiden zu 25 : 1. Daraus folgt, daß durch den Malondialdehydtest nur ca. 4 % der Lipidperoxide nachgewiesen werden können. Dieses bedeutet, daß der Malondialdehyd-Gehalt der Mikrosomen im Inkubationsansatz bei einem Ausgangsgehalt von 0,35 µM einen Lipidperoxidgehalt von 8,75 µM repräsentiert. Da der Cytochrom P450-Gehalt nur 1 µM beträgt und die Nachweisgrenze der Sauerstoffelektrode bei ca. 1 µM O_2 liegt, müssen zum definitiven Ausschluß von lipidperoxidativen Schädigungsmechanismen Versuche bei submikromolaren O_2-Konzentrationen ausgeführt werden.

3.4.2 Schädigung des Enzyms durch CCl_4 unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von NADPH und Bakterien Vibrio fischeri sowie in Gegenwart von Dithionit als Reduktionsmittel (155, 156).

Die Messung submikromolarer Sauerstoffkonzentrationen ist durch die O_2-abhängige Biolumineszenz von Photobakterien möglich (113). Die Bakterien benötigen dabei hypertonische Bedingungen, was sich bei den Untersuchungen jedoch nicht als nachteilig erwies. Neben der Möglichkeit, O_2-Konzentrationen selbst im nanomolaren Bereich noch zu bestimmen, besitzen die Bakterien den Vorteil, selbst O_2 zu verbrauchen und innerhalb von Minuten die O_2-Konzentration von einem mikromolaren Bereich in einen nanomolaren Bereich zu ver-

mindern (Abb. 26). Dieses erscheint trotz der in Abschnitt 3.4.1 und auch hier verwendeten sorgfältigen Anaerobisierungstechnik mit Argon wichtig. Die Anaerobisierung mit Argon ($O_2 \leq 0{,}1$ ppm) ermöglicht theoretisch eine Verminderung der O_2-Konzentration bis auf 1×10^{-10} M. Die Anaerobisierung der Mikrosomen erfolgt durch Aufblasen des Inertgases auf die Oberfläche der Suspension. Während 30 min vermindert sich der O_2-Gehalt der Suspension bis zur Nachweisgrenze der O_2-Elektrode. Der Phasenübergang des O_2 aus der Flüssigkeit in die Gasphase ist demnach ein langsamer Prozess. Dasselbe dürfte in verstärktem Maße für den Phasenübergang des O_2 aus den Zisternae durch die Mikrosomenmembran in das Inkubationsmedium gelten, so daß die aktuelle O_2-Konzentration in der Lipidmembran unbestimmt bleibt. Durch Vorinkubation der Mikrosomen in Gegenwart der Photobakterien kann dieses Problem minimalisiert werden. Dieselbe Überlegung trifft für Dithionit zu, das zugleich anaerobisierende und reduzierende Komponente ist.
Das Prinzip der Vorinkubation und der Sauerstoffbestimmung durch Photobakterien ist in Abb. 26 wiedergegeben. Nach der Zugabe von teilanaerobisiertem CCl_4 fällt die O_2-Konzentration innerhalb weniger Minuten auf das Ausgangsniveau von ca. 1 nM O_2 ab. Vor Beginn der Reaktion durch Zugabe von festem NADP wurde die Suspension vorinkubiert, um einen Ausgleich der O_2-Konzentration in der mikrosomalen Zisternae mit dem Inkubationsmedium zu ermöglichen. Dabei zeigte sich, daß die Resultate unabhängig von der Vorinkubationszeit (5 bis 45 min) waren. Die Zugabe von NADP verursacht eine kurzfristige Erhöhung der O_2-Konzentration auf ca. 30 nM. Diese O_2-Konzentration beträgt ca. 3 % des Cytochrom P450-Gehalts und stellt einen oberen Grenzwert für lipidperoxidative Prozesse dar. Da die Photobakterien den O_2-Gehalt innerhalb von Minuten wieder auf ca. 1 nM herabsetzen, ist bei Inkubationszeiten bis zu 60 min (Abb. 27) dieser Grenz-

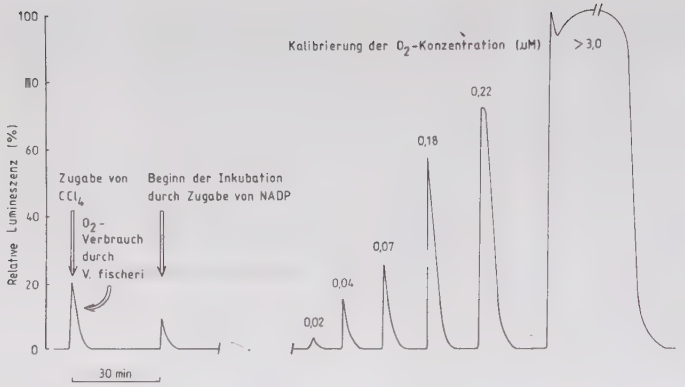


Abb. 26: Bestimmung der O_2-Konzentration während einer Inkubation von Lebermikrosomen mit CCl_4 in Gegenwart von Photobakterien und eines NADPH-regenerierenden Systems

Mikrosomen (1,5 g Protein/l) aus der Leber nicht vorbehandelter weiblicher Wistar-Ratten wurden in Gegenwart des NADPH-regenerierenden Glucose-6-phosphatsystems und 1 mM CCl_4 bei 22° C inkubiert. Die O_2-Konzentration wurde durch die O_2-abhängige Biolumineszenz von Bakterien Vibrio fischeri bestimmt. Nach Zugabe von CCl_4 wurden die Mikrosomen 30 min vorinkubiert um den O_2-Gehalt der Mikrosomen zu minimalisieren. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von festem NADP aus dem Seitenarm des Inkubationsgefäßes. Die Kalibrierung der O_2-Konzentration erfolgte nach der Inkubation durch Zugabe von mit Luft gesättigtem Wasser.
Der Cytochrom P450-Gehalt am Anfang der Inkubation war 1 µM.

wert sicherlich zu hoch. Damit sind innerhalb der experimentellen Grenzen dieser Versuche lipidperoxidative Schädigungen des Cytochrom P450 ausgeschlossen. Wie aus Tabelle 8 und den Abbildungen 27 und 28 ersichtlich, zeigt die Schädigung des Cytochrom P450, die entsprechende Abnahme des mikrosomalen Häm-Gehalts und der Einfluß von EDTA einen dem in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen vergleichbaren Verlauf. Eine experimentelle Bestätgung der Versuche mit NADPH und Photobakterien sind Experimente mit Dithionit als Reduktions- und zusätzliches Anaerobisierungsmittel. Dithionit verbraucht innerhalb weniger Sekunden den mit der O_2-Elektrode noch nachweisbaren O_2-Gehalt (ca. 1 µM O_2) aerober Lösungen. Dazu reduziert das Monomere des Dithionits, $^{\cdot}SO_2^-$, das Cytochrom P450 (159). Ein weiterer Vorteil des Dithionits im Vergleich zu der Verwendung der Photobakterien ist, daß es bei isotonischen Bedingungen und auch bei der physiologischeren Temperatur von 37° C angewendet werden kann. Unabhängig von der Vorinkubationszeit der Mikrosomen mit Dithionit (5-25 min) erfolgt nach Zugabe einer anaeroben Lösung von CCl_4 eine Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts (Abb. 29). Die Schädigung des Cytochrom P450 ist auch in diesem Fall mit einer entsprechenden Abnahme des mikrosomalen Häm-Gehalts verbunden (Daten nicht aufgeführt).

Dadurch konnte zum ersten Mal bewiesen werden (155, 156), daß die Schädigung des Cytochrom P450 durch CCl_4-Metabolismus ohne Gegenwart von O_2 möglich ist. Die Schädigung des Cytochrom P450 durch CCl_4 unter anaeroben Bedingungen wurde inzwischen durch die Arbeiten anderer Autoren bestätigt (138, 160). Die nur geringfügig erhöhte Schädigung des Cytochrom P450 durch CCl_4 in Gegenwart von O_2 im Vergleich zu O_2-freien Bedingungen (Abschnitt 3.4.1, Abb. 21.2) zeigt, daß in vitro die Schädigung des Cytochrom P450 durch endogene und CCl_4-initiierte Lipidperoxidation sowie durch die

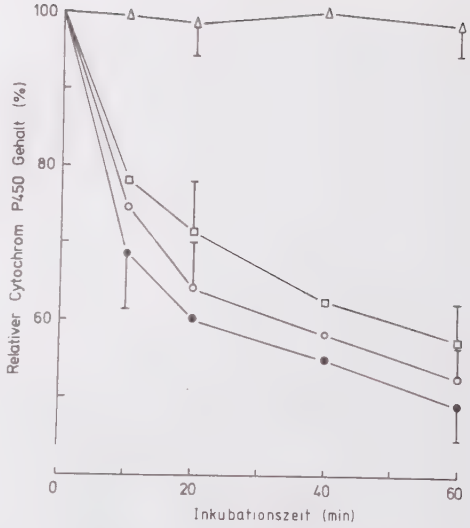


Abb. 27: Abnahme des mikrosomalen Cytochrom P450-Gehalts unter anaeroben (in Gegenwart von Photobakterien) und aeroben Bedingungen in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems

Die Ausgangskonzentration an Cytochrom P450 betrug 1,04 µM (1,5 g mikrosomales Protein/l). Die Inkubationstemperatur betrug 22 °C. Mittelwerte ± s aus 3 Inkubationen sind angegeben. Die Symbole bedeuten: ● , aerob, 1 mM CCl_4; ○ , anaerob, 1 mM CCl_4; □ , anaerob, 1 mM EDTA und 1 mM CCl_4; △ , anaerob ohne CCl_4

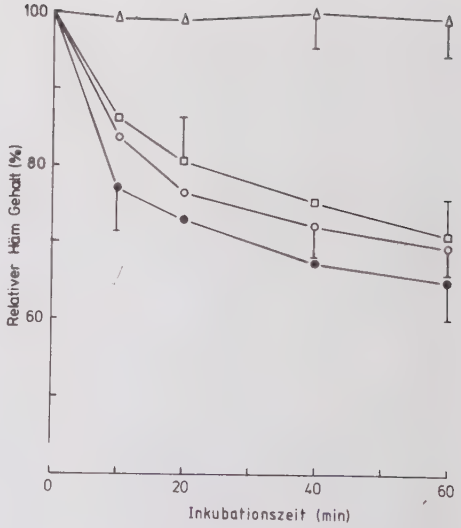


Abb. 28: Abnahme des mikrosomalen Häm-Gehalts unter anaeroben (in Gegenwart von Photobakterien) und aeroben Bedingungen in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems

Die experimentellen Bedingungen waren wie in Abb. 27 angegeben. Das NADPH-reg. System war wie auch bei Abb. 27 das Glucose-6-phosphat-system (2.17). Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus drei Inkubationen. Die Symbole sind wie in Abbildung 27 angegeben.

Tabelle 8

Lipidperoxidation und Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts von Mikrosomen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

O_2	NADPH* (0,15 mM)	CCl_4 (1 mM)	EDTA (1 mM)	Malondialdehyd-Gehalt (µM)	Cytochrom P450-Gehalt (µM)	(%)
aerob und anaerob	-	+	-	0,7 ± 0,2	1,05 ± 0,05	100
aerob	+	+	-	10,7 ± 0,6	0,51 ± 0,06	49
anaerob	+	-	-	0,7 ± 0,1	1,04 ± 0,05	99
anaerob	+	+	-	0,7 ± 0,2	0,56 ± 0,06	53
anaerob	+	+	+	0,7 ± 0,2	0,61 ± 0,07	58

*Das NADPH-regenerierende Glucose-6-phosphatsystem (2.17) gewährleistete über die gesamte Inkubationsdauer von 60 min bei 22 °C eine konstante NADPH-Konzentration von 0,15 ± 0,01 mM, unabhängig von den Inkubationsbedingungen. Der mikrosomale Proteingehalt im Inkubationsansatz war 1,5 g/l. Der Ausgangsgehalt an Cytochrom P450 aus nicht vorbehandelten weiblichen Wistar-Ratten betrug 0,7 nMol/mg mikrosomales Protein. Maßstab der Lipidperoxidation ist die Bildung von Malondialdehyd. Bei aeroben Inkubationen enthielt der Ansatz keine Photobakterien, um während der Inkubationsdauer Aerobiose zu gewährleisten. Die angegebenen Werte des Cytochrom P450-Gehalts sind bei Gegenwart von CCl_4 mit dem Faktor 1,4 aus dem gemessenen Gehalt ermittelt worden, um spektrale Interferenz des CCl_4 bei der Bestimmung auszugleichen. Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus drei unabhängigen Bestimmungen.

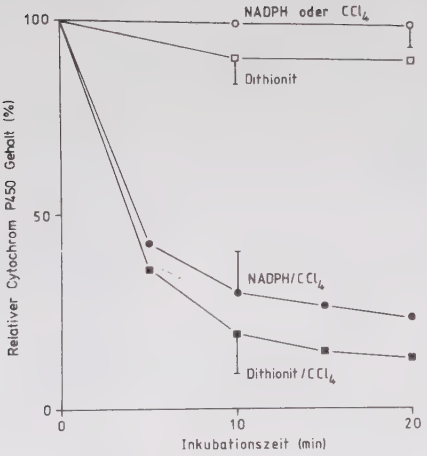


Abb. 29: Abnahme des mikrosomalen Cytochrom P450-Gehalts unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von NADPH oder Dithionit als Reduktionsmittel

Lebermikrosomen aus mit Phenobarbital vorbehandelten weiblichen Wistar-Ratten wurden bei 37 °C in Gegenwart des NADPH-regenerierenden Glucose-6-phosphatsystems (2.17) (NADPH ≈ 0,15 mM) oder Dithionit (Ausgangskonzentration = 1 mM) inkubiert. Die Ausgangskonzentration von CCl_4 war 1 mM und der Ausgangsgehalt an Cytochrom P450 war 1,5 µM bei einem mikrosomalen Proteingehalt von 1 g/l.

Die Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts war von der Zeit (5 - 25 min) zwischen der Zugabe von Dithionit und dem Start der Reaktion durch die Injektion einer anaeroben Lösung von CCl_4 in Ethanol unabhängig.

nur in Gegenwart von O_2 gebildeten CCl_4-Metabolite, $^{\cdot}O_2CCl_3$ und $COCl_2$ (Abb. 6. S.12) eine untergeordente Rolle spielt.

3.4.3 Schädigung verschiedener Formen des Cytochrom P450 durch CCl_4, Bildung von CO, Einfluß von Hemmstoffen und Nachweis der Alkylierung von Cytochrom P450-Formen

Die in vivo Befunde zur Schädigung des Cytochrom P450 durch CCl_4 (3.2.2) erfordern die Annahme lipidperoxidativer oder suizidaler Mechanismen zur Erklärung der Enzymschädigung bei unterschiedlich vorbehandelten Tieren. Die Ergebnisse aus in vitro Versuchen bei Abwesenheit von O_2 schließen peroxidative Schädigungsmechanismen aus (3.4.1, 3.4.2). Andererseits können in vivo aufgrund der unterschiedlichen O_2-Konzentration in der Leber (1.8) und der auch bei geringer O_2-Konzentration in vitro erfolgenden Lipidperoxidation (3.3.2) peroxidative Schädigungsmechanismen nicht ausgeschlossen werden. Rückschlüsse auf in vivo relevante Mechanismen sind durch den Vergleich von Daten aus in vitro Experimenten mit denen aus in vitro Versuchen gegeben. Dabei zeigt sich in einigen Punkten weitgehende Übereinstimmung.

Die Schädigung des Cytochrom P450 in Mikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten weiblichen Ratten unter anaeroben Bedingungen ist in Abb. 30 (156) wiedergegeben. In Übereinstimmung mit in vivo Versuchen an weiblichen (3.2.2) und männlichen (161) Ratten ist die relative Schädigung des Cytochrom P450 bei PB-vorbehandelten Tieren größer als bei nicht vorbehandelten Tieren, wobei diese wiederum größer ist als bei 3-MC-vorbehandelten Ratten. Die absolute Schädigung des Cytochrom P450 entspricht bei 3-MC-vorbehandelten Ratten der bei Vergleichstieren, wiederum in Übereinstimmung mit in vivo Daten (Abb. 15, S.50). Zusätzliches Argument, daß die Lipidperoxidation bei der Schädigung des Cytochrom

P450 auch in vivo eine untergeordnete Rolle spielt, ist die Beobachtung von Levin (146), daß Cytochrom P450 aus PB-vorbehandelten Ratten gegenüber der endogenen Lipidperoxidation wesentlich stabiler ist als das aus 3-MC-vorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten, während, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, Cytochrom P450 PB-vorbehandelter Ratten in Gegenwart von CCl_4 instabiler ist, sowohl in vivo (3.2.2) als auch in vitro in Gegenwart (3.4.1) als auch in Abwesenheit von O_2 (3.4.1 - 3.4.3).

Eine weitere Parallelität zwischen in vivo und in vitro Versuchen ergibt sich aus der Bildung von CO. Die Vorbehandlung von Ratten mit 3-MC und PB stimuliert in Gegenwart von NADPH und CCl_4 unter anaeroben Bedingungen die Bildung von CO (Abb. 31). Eine entsprechende Stimulierung der CO-Bildung wiesen Lindstrom und Anders bei in vivo Versuchen nach (161). In vivo werden bei PB-vorbehandelten Ratten ca. 4 Äquivalente CO pro Mol geschädigtes Cytochrom P450 gebildet. In vitro ergibt sich aus Abb. 31 und 32 ein Wert zwischen 2 und 3 Äquivalenten. Die oxidative Schädigung des Häm aus Cytochrom P450 durch die Häm-Oxygenase kann lediglich die Bildung eines Äquivalents CO erklären (150). Die darüber hinausgehende Bildung von CO erklären Lindstrom und Anders durch die CCl_4-initiierte Lipidperoxidation. Bei Ausschluß von O_2 in vitro kann die CO-Bildung jedoch weder auf Lipidperoxidation noch auf die ebenfalls O_2-abhängige Hämoxygenaseaktivität zurückgeführt werden. Die Bildung des CO erfolgt daher mit großer Wahrscheinlichkeit auch in vivo durch den von Wolf (43) aufgezeigten reduktiven Metabolismus des CCl_4 (vergl. Abb.5, S.10). Ein weiteres wichtiges Argument gegen eine Beteiligung der Hämogenase an der durch CCl_4-verursachten Abnahme des Cytochrom P450-Häm in vivo ist, daß durch CCl_4 keine zusätzliche Bildung von ^{14}CO aus zuvor radioaktiv markiertem Häm das Cytochrom P450 erfolgt (162). Die Bildung von CO ist jedoch wie auch die kovalente Bindung von CCl_4-Metabolite an Lipide (3.2.2) kein quantitativer Maßstab der

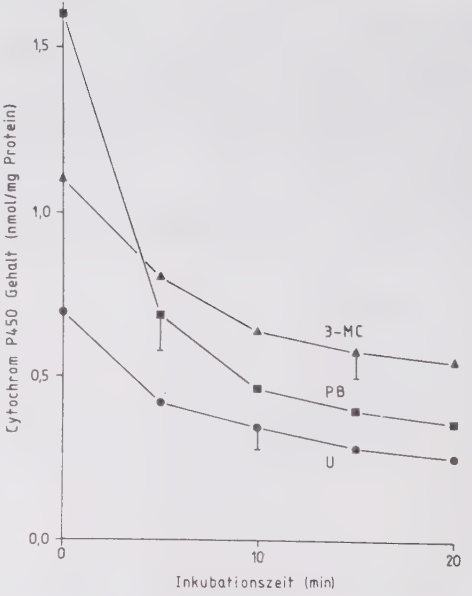


Abb. 30

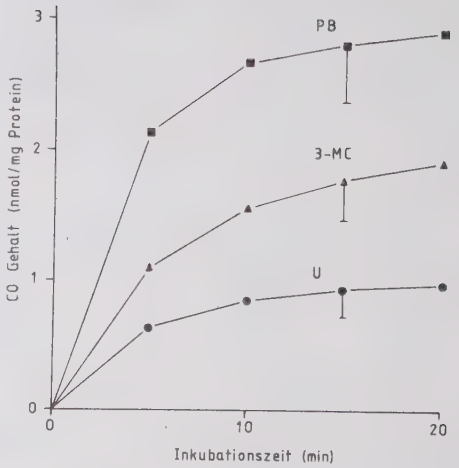


Abb. 31

Abb. 30, 31: Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts (Abb. 30) und Bildung von CO (Abb. 31) während der Inkubation von Mikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten weiblichen Ratten in Gegenwart von CCl_4 und DADPH unter anaeroben Bedingungen

Die Lebermikrosomen (1,5 g/l Inkubationslösung) wurden in Gegenwart von CCl_4 (1 mM) und des NADPH-regenerierenden Glucose-6-phosphatsystems (2.17) bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen ($O_2 < 1$ µM) inkubiert. Tiere: U (●) = nicht vorbehandelt; PB (■) = mit 0,2 % (w/v) Phenobarbital während drei Tagen im Trinkwaaser vorbehandelt; 3-MC (▲) = vorbehandelt mit 0,1 % (w/v) 3-Methylcholanthren in Olivenöl i.p. 48 h bei einer Dosis von 20 mg/kg vor Tötung der Tiere. Jeder Wert ist der Mittelwert ± s aus drei Inkubationen.

Tabelle 9

Bildung von CO und Abnahme des Cytochrom P450- und des Haem-Gehalts von NADPH- oder Dithionit-reduzierten Mikrosomen mit CCl_4 ; Wirkungen von Hemmstoffen

1 mM CCl_4		Abnahme an Cytochrom P450	Abnahme an Haem	Bildung von CO
Reduktionsmittel	Hemmstoff	(nmol/mg Prot.)	(nmol/mg Prot.)	(nmol/mg Prot.)
kein	kein	keine*	keine**	keine
NADPH	kein	1,13 ± 0,19	1,13 ± 0,44	2,8 ± 0,5
NADPH	CO (10 µM)	1,12 ± 0,21	1,27 ± 0,48	—— ++
NADPH	CO (1 mM,gesättigt)	0,40 ± 0,11	——+	—— ++
NADPH	Metyrapon (5 mM)	0,64 ± 0,10	0,66 ± 0,23	1,9 ± 0,5
NADPH	DPPD/O_2 (1 µM/1mM)	0,48 ± 0,20	0,61 ± 0,33	keine
Dithionit	kein	1,23 ± 0,22	1,52 ± 0,52	2,9 ± 0,7
Dithionit	CO (1 mM,gesättigt)	0,48 ± 0,10	——+	——++

* Cytochrom P450-Gehalt: 1,50 ± 0,16 nmol/mg Protein

** Haem-Gehalt : 2,38 ± 0,38 nmol/mg Protein

\+ nicht meßbar in Gegenwart hoher CO-Konzentrationen

++ nicht meßbar aufgrund des zugegebenen CO

Die Inkubationen wurden, bis auf die Inkubation in Gegenwart von DPPD/O_2, unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei 37° C. Die Mikrosomen stammten aus PB-vorbehandelten (3 Tage täglich 80 mg PB/kg in 0,9 % (w/v) NaCl i.p.) weiblichen Wistar-Ratten.

Schädigung des Cytochrom P450. So zeigt das durch 3-MC induzierte Cytochrom im Vergleich zu den konstitutiven Formen dieselbe absolute Schädigung durch CCl_4, jedoch eine vermehrte Bildung von CO (Abb. 30, 31). Die Cytochrom P450-Formen unterscheiden sich offenbar in ihrem Vermögen, CCl_4 zu Cytochrom P450-schädigenden Metaboliten und zu CO zu metabolisieren.

Um den Nachweis zu erbringen, daß die Cytochrom P450-schädigenden Metabolite durch das Enzym selbst gebildet werden, wurden Versuche mit Inhibitoren durchgeführt (156). Die Inhibitoren CO, O_2 und Metyrapon (2-Methyl-1.2-bis(3-pyridyl)-1-propanon) binden an das reduzierte Cytochrom P450 (9, 23, 163). Bei den Experimenten mit O_2 wurde DPPD (N,N'-Diphenyl-p-phenylendiamin) zur Verhinderung der endogenen peroxidativen Schädigung des Cytochrom P450 (146) verwendet (Tab. 9). Alle Inhibitoren vermindern die CCl_4-abhängige Schädigung des Cytochrom P450. Dabei mußten wegen der hohen Affinität des CCl_4 zu reduziertem Cytochrom P450, $K_s(CCl_4)$ = 19 µM (87), hohe Inhibitorkonzentrationen angewendet werden. Geringe Konzentrationen an CO, wie sie unter anaeroben Bedingungen entstehen (Abb. 31), hemmen die Schädigung des Cytochrom P450 nicht (Tab. 9).

Die Experimente sind mit der Annahme eines suizidalen Mechanismus der Cytochrom P450-Schädigung vereinbar. Durch die Versuche nicht ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, daß die Bindung der Inhibitoren an das reduzierte Cytochrom P450 eine präservative Wirkung besitzt ; dies gegenüber einem Angriff reaktiver CCl_4-Metabolite, die möglicherweise durch die Cytochrom P450-Reduktase gebildet werden. Diese Einschränkung beruht auf der Gegebenheit, daß CO auch in hoher Konzentration unter aeroben Bedingungen die CCl_4-initiierte Lipidperoxidation nicht inhibiert (52, 53, 164).

Ebenfalls übereinstimmende Resultate aus in vitro zu in vivo Versuchen ergeben sich aus dem kovalenten Einbau von CCl_4-Metabolite in mikrosomale Proteine. Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 festgestellt wurde, sind bei Gültigkeit der Bindungshypothese aufgrund der geringen Einbaurate der CCl_4-Metabolite spezifische Alkylierungsmechanismen zu fordern. Dieses ist, wie aus einer Arbeit von Sipes (64) hervorgeht, offenbar bei der Kovalentbindung von CCl_4-Metabolite an Proteine der Fall. Nach der Inkubation von Mikrosomen aus PB-behandelten Ratten mit $^{14}CCl_4$ und NADPH befand sich 80 % der an Proteine gebundene Radioaktivität nach der Hydrolyse der Proteine in einer Aminosäure, die von Sipes nicht näher identifiziert wurde. Die Alkylierung erfolgt nicht nur spezifisch sondern wahrscheinlich auch selektiv: Sipes bestimmte an Mikrosomen aus PB-vorbehandelten männlichen Ratten in Gegenwart von 1 mM CCl_4 und NADPH-regenerierendem Glucose-6-phosphatsystem bei 37° C und anaeroben Bedingungen eine Alkylierungsrate von 0,3 nMol ^{14}C/mg Protein x min. Unter nahezu identischen Bedingungen (Abb. 29, S.72) nimmt während 5 min der Cytochrom P450-Gehalt von 1,5 nMol auf 0,4 nMol/mg Protein ab. Somit könnte durch die Annahme einer selektiven, schädigenden Bindung von CCl_4-Metabolite an Cytochrom P450 die Alkylierungsrate von 1,5 nMol/mg Protein x 5 min zu 70 % erklärt werden. Zur Überprüfung der Hypothese wird durch in vivo und in vitro Versuche mit $^{14}CCl_4$ die Selektivität der Bindung von CCl_4-Metabolite an mikrosomale Proteine untersucht(141). Dazu werden nach in vivo oder in vitro Gabe von $^{14}CCl_4$ die Mikrosomen durch mehrmalige Extraktion nach Folch (98) von den Lipiden befreit, mit SDS solubilisiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die mikrosomalen Hämproteine werden vor CCl_4-Gabe durch i.p. Applikation von δ[3.5-$^{3}H(N)$]-Aminolävulinsäure nach Levin (165) spezifisch am Hämring radioaktiv markiert, um dadurch die Cytochrom P450-Formen nach der

elektrophoretischen Auftrennung der Proteine lokalisieren zu können. Das Proteinmuster der Mikrosomen aus PB-vorbehandelten männlichen Ratten (Abb. 32) stimmt mit den Angaben anderer Autoren (166-168) überein. Die Zuordnung der Cytochrom P450-Formen nach dem Molekulargewicht und der ^{3}H-Häm-Markierung ergeben übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 32, 33) und erfolgt nach der Nomenklatur von Ryan (167). Cytochrom $P450_a$ (MG 48000) und Cytochrom $P450_b$ (MG 52000) sind durch PB-Vorbehandlung induzierbar, während Cytochrom $P450_c$ (MG 56000) durch Vorbehandlung der Tiere mit 3-MC induzierbar ist (Abb. 32, 33). Nach in vivo Applikation von $^{14}CCl_4$ bei PB-vorbehandelten Ratten ist die höchste ^{14}C-Aktivität an Cytochromen bei Cytochrom $P450_b$ nachweisbar, Cytochrom $P450_a$ und Cytochrom $P450_c$ werden in geringerem Umfang markiert (Abb. 32). Ein analoges Verteilungsmuster der ^{14}C-Aktivität findet sich nach in vitro Inkubation von Mikrosomen aus PB-vorbehandelten weiblichen Ratten mit $^{14}CCl_4$ unter anaeroben Bedingungen (Abb. 33). Unter aeroben Inkubationsbedingungen ergibt sich qualitativ dasselbe Ergebnis bei insgesamt etwas geringeren ^{14}C-Einbauraten (Daten nicht aufgeführt). Dieses ist in Übereinstimmung mit der vielfach bestätigten Beobachtung, daß in vitro unter anaeroben Bedingungen geringfügig mehr CCl_4-Metabolite an Lipide und Proteine der Mikrosomen kovalent binden als unter aeroben Bedingungen (47, 48, 64, 169). Cytochrom $P450_b$ wird auch bei der Inkubation von Mikrosomen aus nicht vorbehandelten und mit 3-MC vorbehandelten Tieren bevorzugt alkyliert, während die Alkylierung des Cytochrom $P450_a$ von der Vorbehandlung unabhängig ist (Abb. 33). Die spezielle Alkylierung des Cytochrom $P450_b$ steht in Übereinstimmung mit der in vivo (3.2.2) und der in vitro auch unter anaeroben Bedingungen beobachteten (3.4.3, s.o.) größeren Empfindlichkeit des PB-induzierbaren Cytochrom P450 gegenüber einer Schädigung durch CCl_4-Metabolite. Die vorwiegende Alkylierung des Cytochrom $P450_b$ durch

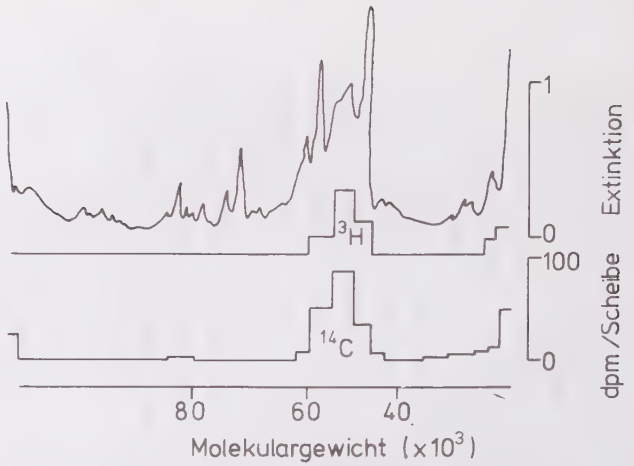


Abb. 32: Elektropherogramm und Verteilung der Radioaktivität nach in vivo Applikation von ^{3}H-Lävulinsäure und $^{14}CCl_4$ in elektrophoretisch aufgetrennten mikrosomalen Proteinen

δ[3,5-^{3}H(N)] -Aminolävulinsäure (1,11 µCi/µMol) wurde in 0,9 % NaCl (w/v) gelöst 6 h vor Tötung der Tiere (Dosis: 0,125 mg/kg) in die Schwanzvene injiziert. 14-CCl_4 (0,56 µCi/µMol) wurde als 5 %ige Lösung in Olivenöl (v/v) 2 h vor Tötung der Tiere i.p. appliziert (Dosis: 0,5 ml/kg). Versuchstiere waren männliche Wistar-Ratten, die 3 Tage 0,2 % PB im Trinkwasser (w/v) erhielten. Pro Gel wurden ca. 100 µg Protein aufgetragen (141).

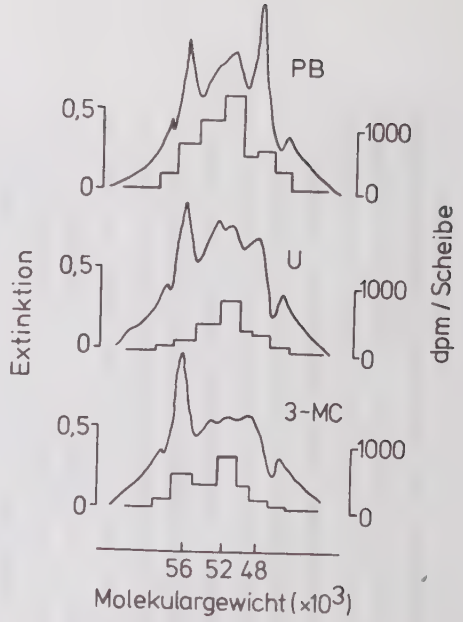


Abb. 33: Elektropherogramm und Verteilung der 14-C-Aktivität nach in vitro Inkubation von Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter weiblicher Ratten mit 14-CCl_4 und NADPH unter anaeroben Bedingungen

Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei 37 °C. Die CCl_4-Konzentration war 0,5 mM (22 µCi 14-CCl_4/µMol). Andere experimentelle Bedingungen waren wie in Abb. 31 angegeben.

CCl_4-Metabolite wird durch die kürzlich veröffentlichte Beobachtung von Noguchi (170) erklärbar, daß nur Cytochrom $P450_b$ aus CCl_4 Trichlormethylradikale bildet im Gegensatz zu den anderen Cytochrom P450-Formen. Cytochrom $P450_b$ ist daher der Bildungsort reaktiver CCl_4-Metabolite und zugleich das Enzym, das durch die Metabolite am ehesten geschädigt wird.

Die Ergebnisse sind insgesamt Bestätigung eines suizidalen, O_2-unabhängigen Schädigungsmechanismus des Cytochrom P450 durch reaktive CCl_4-Metabolite. Diese entstehen auf dem reduktiven Weg der Bildung von CO aus CCl_4. Als schädigende Metabolite kommen das Trichlormethylradikal $^{\cdot}CCl_3$ und das Dichlorcarben $|CCl_2$ in Betracht (Abb. 6, S.12). Aufgrund der Parallelität der Ergebnisse aus in vitro Experimenten unter anaeroben Bedingungen und aus in vivo Versuchen ist anzunehmen, daß dieses auch für in vivo Verhältnisse zutrifft. Eine zusätzliche Schädigung des Cytochrom P450 in vivo durch CCl_4-initiierte Lipidperoxidation oder durch O_2-abhängig gebildete CCl_4-Metabolite kann jedoch nicht definitiv ausgeschlossen werden.
Unklar ist der Ort, an dem der schädigende CCl_4-Metabolit an das Cytochrom P450 bindet. Es sei für die kommende Erörterung betont, daß die Inaktivierung des Cytochrom P450 durch CCl_4-Metabolite stets mit einer Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts und einer dementsprechenden Abnahme des Häm-Gehalts verbunden ist; dies sowohl in vivo als auch in vitro. Als Bindungsorte stehen das Aktivzentrum des Cytochrom P450, das Häm, und der Proteinanteil des Enzyms zur Diskussion.

Die Elektrophoreseversuche legen eine Bindung der CCl_4-Metabolite an das Protein des Cytochrom P450 nahe. Dieses ist jedoch nicht zwingend. Zunächst stellen die Proteine im Molekulargewichtsbereich von 48000 bis 56000 nicht ausschließlich Cytochrom P450-Formen dar. Zum Beispiel besitzt

die Glucuronyltransferase ein Molekulargewicht um 55000 (171, 172) und die Epoxidhydrolase ein Molekulargewicht um 49000 (173). Diese und andere Proteine können durch die verwendete Elektrophoresetechnik nicht von den Cytochrom P450-Formen unterschieden werden, da durch die Methode lediglich Proteine mit der Molekulargewichtsdifferenz von ca. 2500 differenzierbar sind. Die vermehrte ^{14}C-Bindung bei dem Molekulargewicht des Cytochrom $P450_b$ könnte auch durch andere Proteine mit verursacht sein. Des weiteren muß die Bindung von CCl_4-Metabolite an den Proteinanteil des Cytochrom P450 nicht notwendig mit einer Konzentrationsabnahme verbunden sein. Zum Beispiel ist die Inaktivierung des Cytochrom P450 durch das Breitbandantibiotikum Chloramphenicol mit einer kovalenten Bindung von Metaboliten an das Enzym verbunden, ohne daß sich jedoch die Konzentration des Cytochrom P450 und des Häm verändert (174). Die Bindung von CS_2-Metaboliten an das Protein des Cytochrom P450 führt zwar zu einer Inaktivierung und Konzentrationsabnahme des Cytochrom P450, der Häm-Gehalt hingegen bleibt konstant, da das Cytochrom P450 zu Cytochrom P420 denaturiert wird (175, 176). Eine durch CCl_4 verursachte Bildung von Cytochrom P420 wurde in dieser Arbeit in der Regel weder in vivo noch in vitro beobachtet. Lediglich bei Langzeitversuchen (1 ml CCl_4/kg, 24 h) war in Übereinstimmung mit Stripp (177) eine geringe Bildung von Cytochrom P420 spektral nachweisbar. Die von Archakov (178) beobachtete Bildung von Cytochrom P420 ist entweder auf die ungewöhnlich hohe Dosis von 6 ml CCl_4/kg, bei der das CCl_4 als denaturierendes Lösungsmittel wirkt, zurückzuführen oder auf ungenügende pH-Kontrolle bei der spektralen Bestimmung. Die Bindung von CCl_4-Metaboliten an das Protein des Cytochrom P450 erklärt demnach allenfalls die Inaktivierung des Enzyms, nicht aber die Abnahme des Cytochrom P450-Gehalts und auch nicht die korrespondierende Abnahme des Häm-Gehalts. Die Annahme einer kovalenten Bindung von CCl_4-

-Metabolite an das prosthetische Häm des Cytochrom P450 ist nicht in Widerspruch zu den Ergebnissen der Elektrophoreseexperimente, wenn man davon ausgeht, daß das modifizierte Häm im Protein gebunden bleibt. Im Gegensatz zur Alkylierung des Proteins kann die Hämalkylierung die Konzentrationsabnahme des Cytochrom P450, die nicht erfolgende Bildung von Cytochrom P420 und die Abnahme des Häm-Gehalts erklären, vorausgesetzt, daß die Alkylierung des Häm zu einer Freisetzung des Eisenions unter Bildung von alkyliertem Protoporphyrin führt. Die Überprüfung dieser Hypothese ist Gegenstand des folgenden Abschnitts.

3.4.4 Kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an Hämin in Gegenwart von Dithionit als Reduktionsmittel

Im Verlauf dieser Arbeit wurden durch andere Autoren zahlreiche suizidale Reaktionen von mikrosomalen Cytochrom P450 der Leber mit Fremdstoffen weitgehend aufgeklärt. Die Suizidsubstrate, darunter Barbiturate und synthetische Hormone, besitzen eine Ethylen- oder Azetylengruppe ($H_2C{=}CH{-}R$ oder $HC{\equiv}C{-}R$). Die Suizidmechanismen sind im Gegensatz zu CCl_4 O_2-abhängig und führen zur Bildung von sogenannten "green pigments", die als N-alkylierte Porphyrine identifiziert wurden (179-186). Die Substrate werden dabei O_2-abhängig durch Cytochrom P450 formal epoxidiert und die reaktiven Epoxide alkylieren einen Stickstoff des Porphyrinsystems, wobei das zentrale Eisenion freigesetzt wird (Abb. 34).

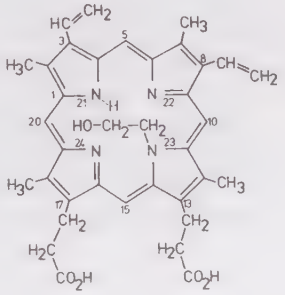


Abb. 34: Struktur des durch die O_2-abhängige suizidale Reaktion des Cytochrom P450 mit Ethylen unter Freisetzung des zentralen Hämeisenions gebildeten N-Alkylporphyrins (180). Die Struktur zeigt eines von insgesamt 4 möglichen Isomeren N-alkylierter Porphyrine (grüne Pigmente)

Dadurch könnten, wie schon bei Beginn dieser Arbeit im Falle des CCl_4 vermutet, die Abnahme der Monooxygenaseaktivität, die Konzentrationsabnahme des Cytochrom P450 und darüber hinaus die Abnahme des Häm-Gehalts der Mikrosomen erklärt werden. Die Bildung von grünen Pigmenten führt zu einer grünlichen Verfärbung der rotbraunen Mikrosomen. Die grünen Pigmente zeigen im wesentlichen dasselbe Absorptionsspektrum wie Protoporphyrin IX, jedoch mit Absorptionsmaxima bei längeren Wellenlängen (bathochrome Verschiebung) und auch eine rote Fluoreszenzemission. Nach in vivo und in vitro Versuchen mit $^{14}CCl_4$ sind durch die in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden keine grünen Pigmente nachweisbar, in Übereinstimmung mit einer Beobachtung von Levin im Jahre 1972 (145). Die Extraktion der mikrosomalen Häme, die zuvor nach Levin (165) mit ^{3}H-Aminolävulinsäure markiert wurden, zeigt, daß mit den Hämen auch ^{14}C-Aktivität aus $^{14}CCl_4$ extrahiert werden kann. Diese ^{14}C-Aktivität ist von der ^{3}H-Aktivität chromatographisch nicht trennbar. Dies zeigt, daß die ^{14}C-Aktivität nicht durch Verunreinigung durch alkylierte Lipide oder Proteine erklärt werden kann. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Suizidsubstraten bilden CCl_4-Metabolite offenbar mit der prosthetischen Hämgruppe des Cytochrom P450 (Abb. 39.1) kovalente Produkte, die noch das Eisenion enthalten. Nach der Freisetzung des Eisenions aus den isolierten Hämen mit den üblichen Methoden (91) ist zwar ^{3}H-markiertes Protoporphyrin IX nachweisbar, nicht aber ^{14}C-markierte Porphyrine. Es entsteht eine Vielzahl ^{14}C-markierter Produkte, die keine spektrale Ähnlichkeit mit Porphyrinen besitzen. Das kovalente Produkt aus CCl_4-Metaboliten und Cytochrom P450-Häm ist demzufolge als Porphyrin wesentlich instabiler als die bisher in der Literatur beschriebenen N-Alkylporphyrine (179-186).

Um das durch CCl_4-Metabolite alkylierte Häm und das nach

der Eisenfreisetzung zu fordernde Alkylporphyrin charakterisieren zu können, mußte auf eine Modellreaktion zurückgegriffen werden. Als geeignet erwies sich die Reaktion des freien, d.h. nicht proteingebundenen Häm mit CCl_4 in Gegenwart von Dithionit als Reduktions- und zusätzliches Anaerobisierungsmittel. In einem Vorversuch dazu zeigte sich, wie bereits in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, daß in Gegenwart von CCl_4 die Reduktion der Mikrosomen durch NADPH oder Dithionit zu einer vergleichbaren Schädigung des Cytochrom P450 führt. Dithionit kann im Gegensatz zu NADPH auch freies Fe^{3+}-Protoporphyrin (Hämin, Abb. 39.1) zu Fe^{2+}-Protoporphyrin (Häm) reduzieren (Abb. 35.1). Darüber hinaus erlaubt die Anwesenheit von Dithionit (λ_{max} = 314 nm) die spektrale Bestimmung der Häme und Porphyrine zwischen 380 und 700 nm.
Dithionit reduziert innerhalb von Sekunden freies Hämin zu Häm und nach Zugabe von CCl_4 bildet sich innerhalb von Minuten ein neues, deutlich von Häm unterscheidbares Spektrum aus (Abb. 35.1). Dieses verändert sich nach Reoxidation der Reaktionslösung praktisch nicht (Abb. 35.2). Die Reaktionslösung zeigt unter anaeroben und aeroben Bedingungen keine Bildung von Protoporphyrin IX (Abb. 35.2) und auch keine Bildung eines anderen Porphyrins, das durch eine Fluoreszenzemission zwischen 600 und 700 nm nachweisbar wäre. Die Häme können nach der Inkubation mit CCl_4 durch Zugabe von Salzsäure bei einem pH von 1 quantitativ gefällt werden. Die Eisenbestimmung im häm-freien Überstand mit Bathophenanthrolinsulfonsäure zeigt keine vom Reagentienleerwert abweichende Extinktion. Damit ist unabhängig von der nicht nachweisbaren Bildung von Porphyrinen bewiesen, daß während der Inkubation kein Eisenion aus dem Häm freigesetzt wird. Die Inkubation von Protohäm mit CCl_4 und Dithionit führt auch zu einer Abnahme des Häm-Gehalts (Abb. 36), gemessen als Pyridinhämochromogen (2.8). Dabei verschiebt sich unter Intensitätsver-

minderung (hypsochromer Effekt) das langwellige Absorptionsmaximum des Pyridinprotohämochromogen von 557 nach 551 nm (hypsochrome Verschiebung). Der auch im Vergleich zu dem Pyridinmesohämochromogen abnormale hypochrome Effekt (Abb. 36) erklärt die Abnahme des Hämgehalts, ohne daß eine Freisetzung des Eisenions aus der prosthetischen Hämgruppe des Cytochrom P450 gefordert werden muß.

Bei Verwendung von $^{14}CCl_4$, quantitativer Fällung des Produkts mit Salzsäure und nach mehrmaligem Waschen des Sediments mit 0,1 N Salzsäure ist unter Berücksichtigung der Bildung des abnormalen Hämprodukts die kovalente Bindung von ca. 2,4 Mol CCl_4-Metaboliten pro Mol Protohäm nachweisbar. Zu einem ähnlichen Ergebnis führt die gravimetrische Bestimmung des Produkts eines präparativen Ansatzes: 130 mg Protohäminchlorid, Molekulargewicht 652, ergeben nach quantitativer Isolierung 170 mg Produkt. Dies entspricht bei einer Ausbeute von 100 % einer Molekulargewichtserhöhung um 200. Bezogen auf das Molekulargewicht 118,5 des $^{\cdot}CCl_3$ bzw. 83 des $|CCl_2$ ergibt sich, daß ca. 1,7 Mol $^{\cdot}CCl_3$ bzw. 2,4 Mol $|CCl_2$ kovalent an das Protohäm gebunden werden. Die Bestimmung der Reduktionsäquivalente, die zur Bildung des Produkts notwendig sind, konnte nicht durchgeführt werden, da sowohl Protohäm als auch das Produkt die Reaktion des Dithionits mit CCl_4, das im Überschuß zu Protohäm vorhanden sein muß, katalysiert (Abb. 37). Die katalytische Aktivität des Produkts aus Häm und CCl_4-Metaboliten weist aber darauf hin, daß die Alkylierung nicht in der Nähe des zentralen Eisenions sondern an der Peripherie des Porphyrinsystems erfolgt.

Das Eisenion in dem synthetischen Produkt aus Protohäm und CCl_4-Metaboliten ist wesentlich fester gebunden als in Protohäm. Die Eisenionfreisetzung aus dem synthetischen Produkt gelang mit einer neu entwickelten Methode unter anaeroben Bedingungen (s. Abschnitt 2.19). Die bei der Eisenfreisetzung ent-

stehenden Produkte wurden durch DC aufgetrennt. Das Spektrum der Hauptfraktion der rot fluoreszierenden Porphyrine ist in Abbildung 38 wiedergegeben. Im Gegensatz zu N-alkylierten Porphyrinen, die in bezug auf Protoporphyrin IX eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsbanden aufweisen (179-186), zeigt das ^{14}C-markierte Porphyrin eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima, die etwas geringer ist als die von Mesoporphyrin und Hämatoporphyrin (Abb. 38). Mesoporphyrin (vergl. Abb. 39) besitzt im Vergleich zu Protoporphyrin anstelle der Vinylgruppen in Position 3 und 8 des Porphyrinsystems Ethylgruppen und das Hämatoporphyrin α-Hydroxyethylgruppen (Abb. 39). Die Sättigung des Vinyldoppelbindung führt demnach zu einer hypsochromen Bandenverschiebung. Da dies auch bei dem synthetischen Produkt der Fall ist und ca. 2 Mol CCl_4-Metabolite pro Mol Protoporphyrin gebunden werden, sind die Vinylgruppen der wahrscheinlichste Angriffsort der CCl_4-Metabolite. Aufgrund der ungenauen Stöchiometrie der Reaktion kann nicht entschieden werden, ob das Trichlormethylradikal $^{\cdot}CCl_3$ oder das Dichlorcarben $|CCl_2$ der reaktive CCl_4-Metabolit ist. Beide Metabolite sind ausreichend elektrophil, wobei das Radikal an das C(α) der Vinylsubstituenten radikalisch binden dürfte, während das Carben eine Cycloaddition mit der Vinylgruppe eingeht (Abb. 39). Die genaue Charakterisierung des Produkts durch Infrarot-, ^1H-Kernresonanz- und Massenspektrometrie ist wegen der Instabilität der Verbindung gegenüber Licht, pH und O_2 bisher nicht gelungen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Schädigung des Cytochrom P450 durch die kovalente Bindung reaktiver CCl_4-Metabolite an das Porphyrinsystem erfolgen kann, ohne daß das Eisenion aus dem Häm freigesetzt werden muß. Der hypochrome Effekt der Metabolitbindung auf das Pyridinhämochromogenspektrum kann die spektrale Abnahme des Häm-Gehalts erklären, obgleich das Häm nicht zerstört wird.

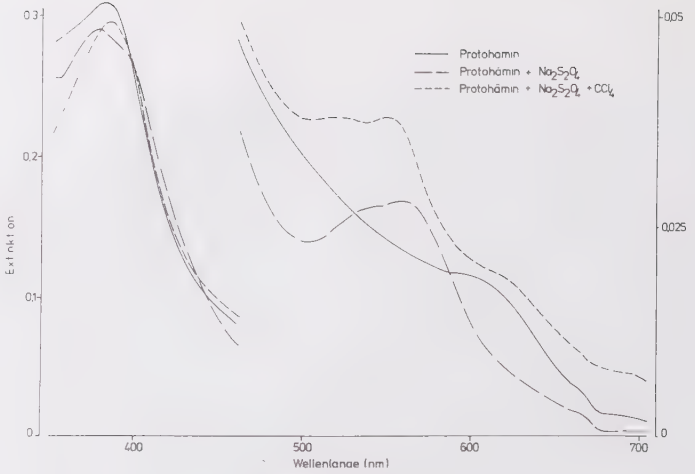


Abbildung 35.1

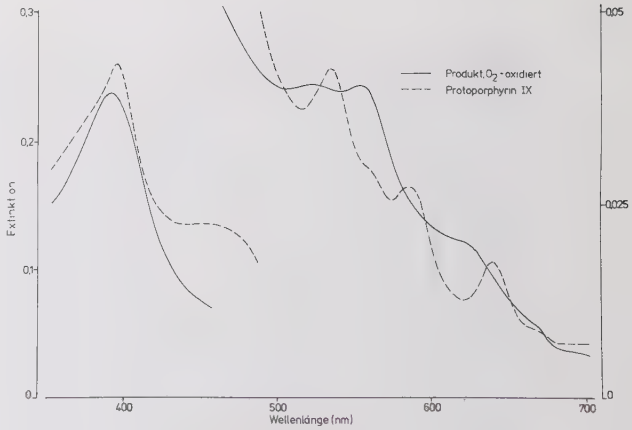


Abbildung 35.2

Abb. 35: Spektrum von Protohämin und spektrale Änderung durch Zugabe von Dithionit und CCl_4 (Abb. 35.1), Spektrum der mit O_2 reoxidierten Reaktionslösung und Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des Protoporphyrin IX (Abb. 35.2)

Die anaerobe Lösung von Protohämin (18,5 µM) in KCl/Tris-Puffer (100 mM/50 mM, pH 7,4) wurde mit anaeroben Lösungen von Dithionit (1mM) und nachfolgend CCl_4 (2,07 mM) versetzt (Abb. 35.1); der spektrale Vergleich der mit O_2 reoxidierten Lösung mit Protoporphyrin IX ist in Abb. 35.2 wiedergegeben. Die Konzentration des Hämin wurde durch das Pyridinhämochromogenspektrum bestimmt (2.8) und die des Dithionnits durch die Absorption bei 314 nm unter der Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von 8000 $M^{-1} cm^{-1}$ (187).

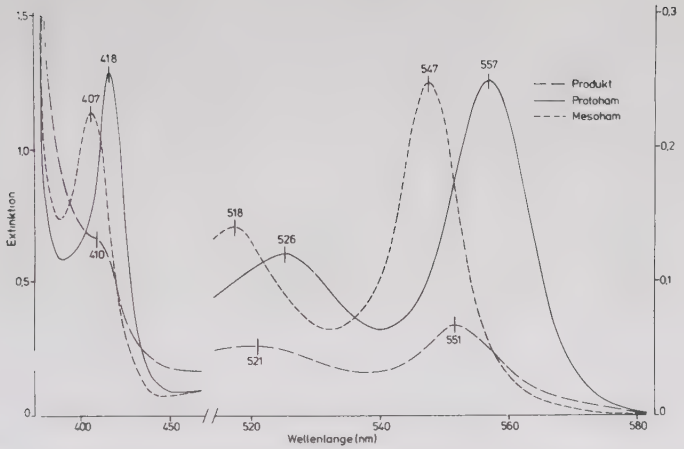


Abb. 36: Pyridinhämochromogenspektrum von Protohäm, Mesohäm und des Produkts des Protohäms mit CCl_4-Metaboliten

Die Konzentration des Protohäms vor der Inkubation mit CCl_4 war 7,52 µM; die Konzentration des Mesohäms war ebenfalls 7,52 µM, basierend auf dem molaren Extinktionskoeffizienten von 33,2 $mM^{-1} cm^{-1}$ (91).

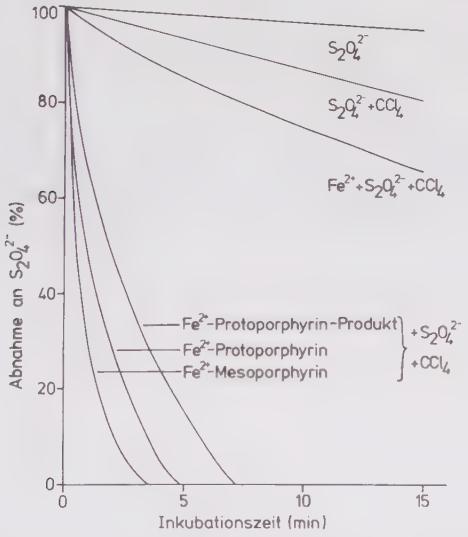


Abb. 37: Zeitliche Abnahme der Dithionitkonzentration bei der Inkubation mit CCl_4 und katalytische Wirkung von Eisenionen

Dithionit, 155 µM in KCl/Tris-Puffer (100 mM/50 mM, pH 7,4), wurde unter anaeroben Bedingungen mit CCl_4 (465 µM) in Abwesenheit oder Gegenwart von 15,5 µM Fe^{2+} bei 22 °C inkubiert. Die Abnahme des Dithionits wurde bei 314 nm kontinuierlich photometrisch registriert.

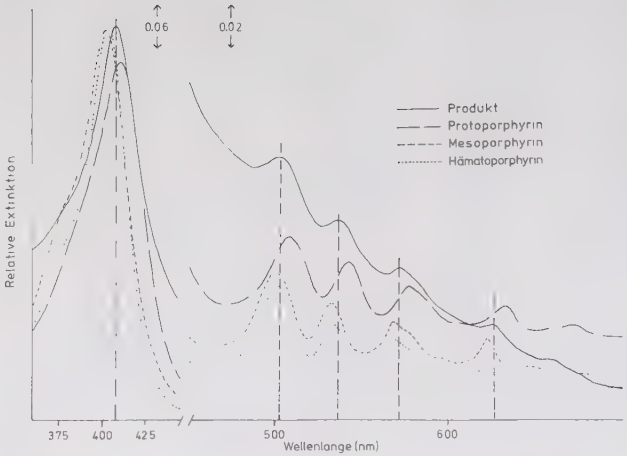


Abb. 38: Absorptionsspektren verschiedener Porphyrine

Die Absorptionsspektren wurden in absolutem Pyridin aufgenommen. Das Produkt aus Protohäm und CCl_4-Metaboliten wurde nach der Freisetzung des Eisenions nach 2.18 und nachfolgender dünnschichtchromatogrphischer Reinigung mit dem Fließmittelsystem Benzol/Methanol/Eisessig (85:3:12, v/v/v) als Porphyrinhauptfraktion isoliert.

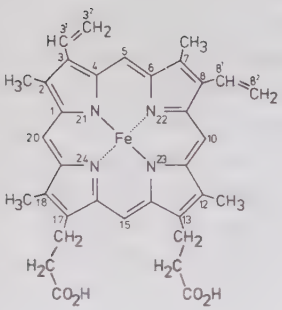


Abb. 39.1: $Fe^{2+/3+}$-Protoporphyrin IX (Häm und Hämin)

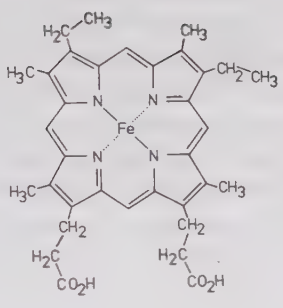


Abb. 39.2: Mesohäm(in)

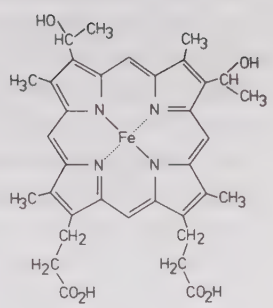


Abb. 39.3: Hämatohäm(in)

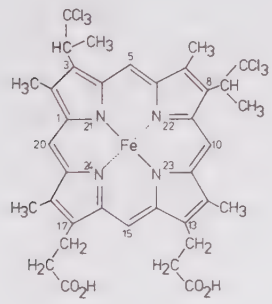


Abb. 39.4: Struktur des kovalenten 2:1-Produkts von $^{\bullet}CCl_3$ mit dem Häm(in) des Cytochrom P450

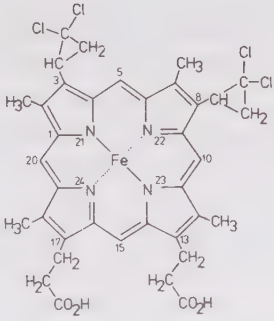


Abb. 39.5: Struktur des kovalenten 2:1-Produkts von $^{|}CCl_2$ mit dem Häm(in) des Cytochrom P450

Abb. 39: Strukturformeln von Häm-in-en und der durch die suizidale Reaktion von Häm(in) des Cytochrom P450 mit den reaktiven CCl_4-Metaboliten $^{\bullet}CCl_3$ (Abb. 39.4) und $^{|}CCl_2$ (Abb. 39.5) postulierten Produkte.

Die Vinylsubstituenten des Protohäm sind der wahrscheinlichste Ort der Metabolitbindung.

Die Befunde eröffnen einen neuen Ansatzpunkt zur biochemischen Erklärung der CCl_4-Toxizität. Die lediglich periphere Modifizierung der prostetischen Hämgruppe des Cytochrom P450 durch O_2-unabhängig gebildete CCl_4-Metabolite ohne Freisetzung des zentralen Eisenions bedeutet, daß Cytochrom P450 prinzipiell enzymatisch aktiv bleiben kann, wenn auch bei veränderter Substratspezifität. Die Annahme, daß das modifizierte Cytochrom P450 zentraler Ort der Bildung O_2-abhängiger CCl_4-Metabolite und/oder lipidperoxidativer Sauerstoffmetabolite ist, erklärt bislang nicht verstandene Phänomene der CCl_4-Toxizität.

1) Die Entstehung einer zentrilobulären Nekrose: Cytochrom P450 metabolisiert O_2-unabhängig CCl_4 zu reaktiven Metaboliten, die nachfolgend das Enzym durch Alkylierung der Vinylsubstituenten des prosthetischen Häms modifizieren. Die Reaktion wird durch O_2 inhibiert (3.4.3, Tabelle 9) und findet daher bevorzugt am Ort der geringsten O_2-Konzentration der Leber, nämlich zentrilobulär statt. Die O_2-abhängigen Schädigungen anderer mikrosomaler Enzyme (3.3) und der mikrosomalen Membran erfolgen danach über Metabolite, die durch das modifizierte Cytochrom P450 gebildet werden, also ebenfalls zentrilobulär. Damit wäre auch die zentrilobuläre Schädigung der Glucose-6-Phosphatase erklärt.

2) Die erhöhte Empfindlichkeit PB-vorbehandelter Tiere gegenüber CCl_4 im Vergleich zu nicht vorbehandelten und mit 3-MC vorbehandelten Tieren: Die durch PB induzierbare Cytochrom P450-Form, Cytochrom $P450_b$, ist obgleich durch CCl_4-Metabolite bevorzugt inaktiviert (3.2.2; 3.4.3) in der modifizierten Form der zentrale Ort der toxischen Folgeereignisse. Dies erklärt unter anderem die vermehrte Schädigung der Glucose-6-Phosphatase, die zeitlich frühere, morphologisch nachgewiesene Auflösung des ER der Leberparenchymzellen (134)

und die geringere $LD_{50}(CCl_4)$-Dosis (135) bei PB-vorbehandelten Tieren.

3) Die Tatsache, daß CO die enzymatische Aktivität des intakten Cytochrom P450 inhibiert, nicht aber die CCl_4-initiierte Lipidperoxidation (52, 53, 164): Das durch CCl_4-Metabolitbindung modifizierte Cytochrom P450 besitzt eine veränderte Substratspezifität und ist offenbar nicht mehr in der Lage CO zu binden, was auch die Abnahme des durch CCl_4-Metabolite verursachten Cytochrom P450-Gehalts, der über den CO-Komplex bestimmt wird, zeigt. Das modifizierte Cytochrom P450 ist der metabolische Ort der Bildung lipidperoxidativer Metabolite und kann CCl_4 und/oder O_2 metabolisieren.

Die Inaktivierung des Cytochrom P450 durch die Modifizierung der prosthetischen Hämgruppe in bezug auf die physiologischen enzymatischen Aktivitäten ist somit in Hinblick auf die Toxizität eine Aktivierung.

3.4.5 Kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an das Porphyrin des Cytochrom P450 in vitro und in vivo

Die Isolierung der durch CCl_4-Metabolite in vitro und in vivo entstehenden alkylierten Porphyrine war noch komplexer als die der Modellreaktion. Dadurch wurde die zusätzliche Veresterung der Porphyrine mit stabilisierendem Effekt und verbesserter Trennungsmöglichkeit durch DC notwendig. Ein Bild von der Komplexizität gibt Abb. 40 wieder. Nach der anaeroben Inkubation von Mikrosomen aus PB-vorbehandelten männlichen Ratten in Gegenwart von NADPH und $^{14}CCl_4$ ergibt die DC-Auftrennung der extrahierten Häme das in Abb. 40 A aufgezeigte Produktmuster. Die Produkte 5 und 7 sind Hämine und Häme. Nach der Freisetzung des Eisenions und nachfolgender Veresterung der Porphyrine ergibt sich die in Abb. 40 B und D aufgezeichnete Produktpalette. Die Hauptfraktionen B 11 und D 11' wurden noch einmal chromatographiert und zeigen nur eine geringe Ausbeute an ^{14}C-markierten, rot fluoreszierenden Porphyrinen. Das Produkt C 24 war jedoch bei der Mehrzahl der Versuche das Hauptprodukt und konnte mit den bisher bekannten Estern durch DC verglichen werden (Abb. 41). Es ist in 2 Fließmittelsystemen mit dem Ester aus der Modellreaktion identisch und unterscheidet sich auch durch die ^{14}C-Markierung von Proto-, Meso- und Hämatoporphyrin-IX-dimethylester. Ebenfalls identisch mit dem Ester aus der Modellreaktion ist das nach in vivo Applikation von CCl_4 isolierte Produkt (Abb. 42). In einem Fall gelang auch der Nachweis von ^{14}C-markierten Porphyrinen aus in vivo Versuchen mit $^{14}CCl_4$, die sich in ihrem R_f-Wert deutlich von Proto-, Meso- und Hämatoporphyrin IX unterscheiden (Abb. 43). Den spektralen Vergleich der durch CCl_4-Metabolite alkylierten Porphyrinester aus in vivo, in vitro und Modellversuchen zeigt Abb. 44.1, den der Fluoreszenzemissionsspektren Abb. 44.2. Allen Produkten gemeinsam sind Absorptions- bzw. Fluoreszenzemissionsmaxima bei Wellenlängen zwischen

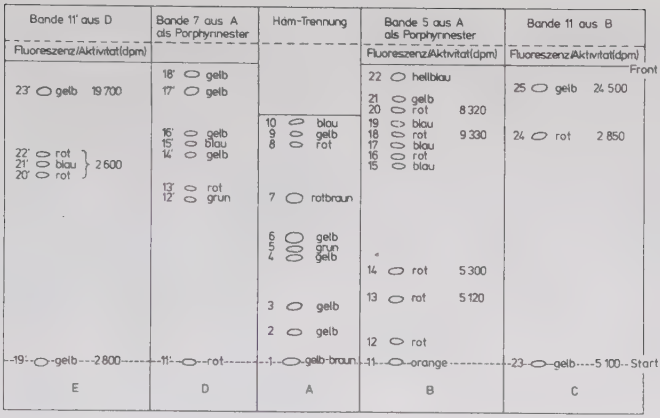


Abb. 40: DC-Auftrennung des Hämextrakts aus unter anaeroben Bedingungen mit $^{14}CCl_4$ und NADPH inkubierten Mikrosomen

Der anaerobe Inkubationsansatz, 130 ml, enthielt Mikrosomen (4,85 mg Protein/ml) aus mit PB vorbehandelten männlichen Wistar-Ratten (3 Tage 0,2 % PB (w/v) im Trinkwasser, CCl_4 (2,78 mM, 29 µCi 14-CCl_4/l) und das NADPH-regenerierende Glucose-6-phosphatsystem (2.17). Die Inkubationsdauer betrug 1 h bei 27 °C. Die Extraktion der Häme aus den sedimentierten Mikrosomen erfolgte mit Pyridin/Wasser (2:1, v/v). Die Eisenfreisetzung und Veresterung der Porphyrine erfolgte nach 2.19. Fließmittel waren: A: 88 ml $CHCl_3$/MeOH (2:1, v/v) und 12 ml Eisessig/Wasser (2:1, v/v); B und D: Toluol/Aceton (9:1, v/v) und für C und E: Isopropanol/Pyridin (7:3, v/v).

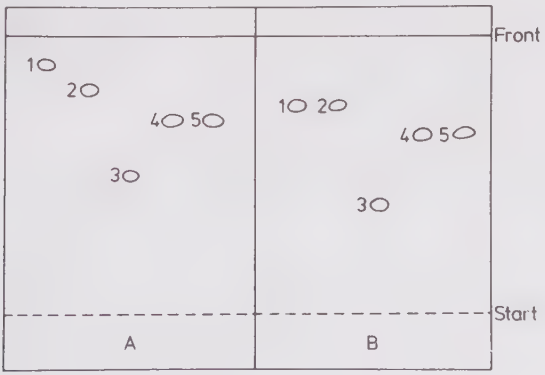


Abb. 41: DC-Vergleich der durch CCl_4-Metabolite alkylierten Dimethylester aus der Modellreaktion und der in vitro Inkubation mit Mikrosomen und NADPH

Fließmittel waren: A: Benzol/Eisessig/Dioxan (8:1:1, v/v/v); B: Toluol/Chloroform/Pyridin (9:9:2, v/v/v). 1 = Protoporphyrindimethylester; 2 = Mesoporphyrindimethylester; 3 = Hämatoporphyrindimethylester; 4 = Ester aus in vitro Versuch; 5 = Ester aus der Modellreaktion

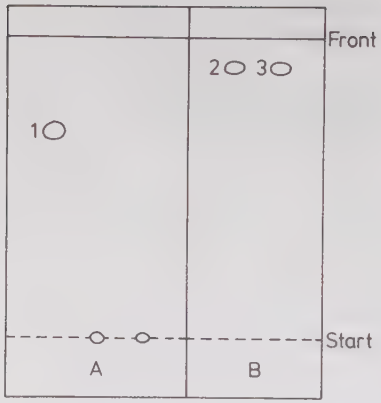


Abb. 42: DC-Vergleich der durch CCl_4-Metabolite alkylierten Porphyrinester aus in vitro und in vivo Versuchen

Fließmittelsysteme waren:
A: Benzol/Aceton (9:1, v/v);
B: Isopropanol/Pyrididin (7:3, v/v) oder Ethanol
1 = Protoporphyrindimethylester
2 = Ester aus in vitro Versuch
3 = Ester aus in vivo Versuch

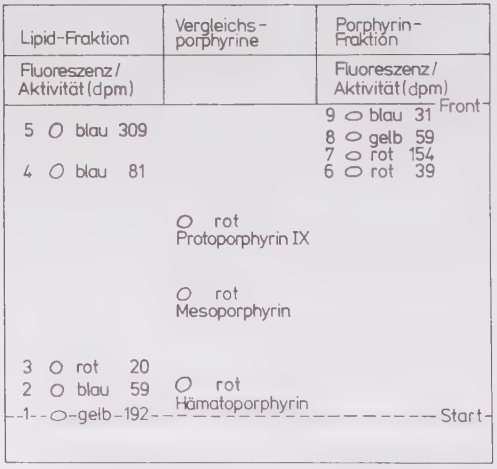


Abb. 43: DC-Nachweis der Alkylierung des Porphyrinrings des Cytochrom P450 nach in vivo Applikation von CCl_4

PB-vorbehandelte männliche Wistar-Ratten (3 Tage 0,2 % PB (w/v) im Trinkwasser) erhielten i.p. pro kg 1 ml CCl_4, enthaltend 69,4 µCi 14-CCl_4 in 10 ml Olivenöl gelöst. Nach 2 h wurden die Mikrosomen isoliert und daraus die Lipide durch viermalige Extraktion mit $CHCl_3$/MeOH (2:1, v/v) entfernt. Danach erfolgte die Extraktion der Häme mit Aceton/$HCl_{konz.}$ (8,5:1,5, v/v) und die Eisenionfreisetzung durch Erwärmen des Extrakts in Gegenwart von 1,5 % (w/v) Fe_2SO_4 während 15 min auf 40 °C. Fließmittelsystem war: Benzol/MeOH/Eisessig (5:0,8:4,2, v/v/v).

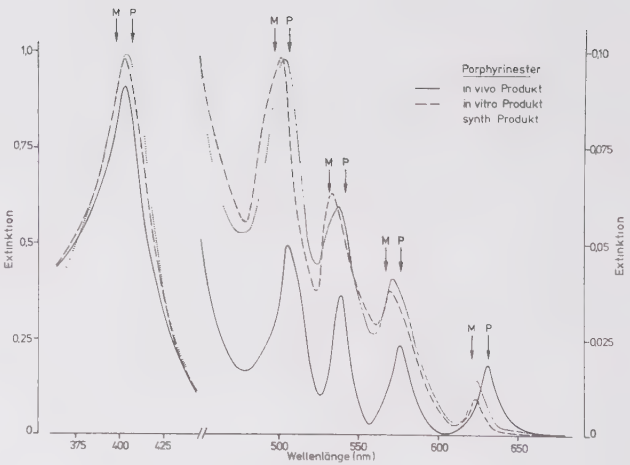


Abbildung 44.1

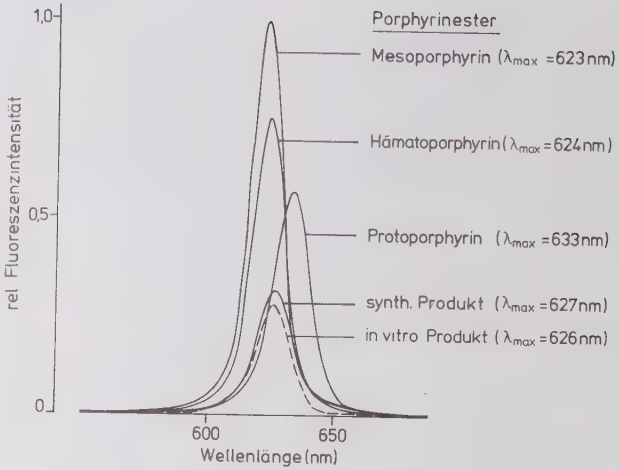


Abbildung 44.2

Abb. 44: Absorptionsspektren (Abb. 44.1) und Fluoreszenzemissionsspektren (Abb. 44.2) verschiedener Porphyrinester

Die Spektren wurden in Pyridin als Lösungsmittel aufgenommen. Die Konzentration der Porphyrine war ca. 5,8 µM bezogen auf den Protoporphyrindimethylester (Extinktion der Soretbande bei 400 nm ≈ 1). Die Pfeile in Abb. 44.1 geben die Wellenlänge der Absorptionsmaxima des Mesoporphyrindimethylesters (M) und die des Protoporphyrinesters (P) an. Die Fluoreszenzanregungswellenlänge war 405 nm. Das in vitro Produkt entstammt der anaeroben Reaktion von Mikrosomen mit CCl_4 und NADPH als Reduktionsmittel. Das synthetische Produkt wurde nach der Reaktion von Protohäm mit CCl_4 und Dithionit als Reduktionsmittel isoliert. Das Fluoreszenzemissionsmaximum des Produkts aus in vivo Versuchen entspricht dem aus den in vitro Versuchen isolierten Produkten. Aufgrund der Instabilität beider Produkte wurde nur das etwas stabilere in vitro Produkt in Abb. 44.2 wiedergegeben.

denen der Dimethylester von Proto- und Mesoporphyrin.

Insgesamt zeigen die Versuche, wenn auch bei unbefriedigender Reproduzierbarkeit der Produktausbeute, daß das Häm des Cytochrom P450 auch in vivo und in vitro durch CCl_4-Metabolite alkyliert wird. Die spektrale Ähnlichkeit der Produkte mit dem aus der Modellreaktion und die kovalente Bindung von $^{14}CCl_4$-Metaboliten an das Porphyrin des Cytochrom P450 zeigen, daß auch in vivo die Vinylsubstituenten des Häm alkyliert werden.

Damit ist der Nachweis erbracht, daß die Inaktivierung des Cytochrom P450 durch CCl_4-Metabolite in vivo wie auch in vitro auf eine O_2-unabhängige suizidale Alkylierung der Vinylsubstituenten der prosthetischen Hämgruppe zurückzuführen ist.

4 Zusammenfassung

Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist der erstmalige Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Metabolisierung (Giftung) des Lebernekrose verursachenden Tetrachlorkohlenstoffs und einer biochemisch faßbaren Schädigung der Leber. Die konstitutive und durch Phenobarbital induzierbare Form des mikrosomalen Cytochrom P450 mit einem Molekulargewicht von 52000 (Abschnitte 3.2.2; 3.4.2) metabolisiert in einer O_2-unabhängigen Reaktion (3.4.1; 3.4.2) den Tetrachlorkohlenstoff zu reaktiven Metaboliten, die diese terminale Monooxygenase durch Alkylierung der prosthetischen Hämgruppe inaktivieren. Diese als suizidale Reaktion erkannte Inaktivierung erfolgt wahrscheinlich durch die Bindung von zwei Metaboliten an die beiden Vinylsubstituenten der Hämgruppe (3.4.4; 3.4.5) und erklärt die Abnahme der Monooxygenaseaktivität, des Cytochrom P450-Gehalts und des Häm-Gehalts der Leber. Als reaktive Metabolite kommen nur das Trichlormethylradikal und das Dichlorcarben in Betracht, nicht hingegen die sauerstoffhaltigen Metabolite Phosgen oder das Trichlormethylsauerstoffradikal. Diese Ergebnisse wurden durch die Kombination sich ergänzender Resultate aus einer Modellreaktion (3.4.4), Versuchen in vitro (3.4.1; 3.4.3) unter extrem O_2-freien Bedingungen ($0{,}1\ nM < O_2 < 1\ \mu M$) und Versuchen in vivo (3.2.2; 3.4.3; 3.4.5) erzielt. Eine Mitbeteiligung oxidativer Schädigungsmechanismen bei der Inaktivierung des Cytochrom P450 durch CCl_4 in vivo kann nicht ausgeschlossen werden, spielt jedoch eine untergeordnete Rolle. Die durch CCl_4 verursachte Erhöhung des Calciumgehalts der Leber bewirkt keine zusätzliche Schädigung des Cytochrom P450 oder der Glucose-6-Phosphatase durch Ca^{2+}-aktivierbare Proteasen oder Lipasen der Leber (3.2.1). Der nach Vitamin D_3-Vorbehandlung beobachtete Schutzeffekt auf die CCl_4-bedingte Schädigung des Cytochrom P450 (3.2.2) kann nicht auf den durch Vitamin D_3 zusätzlich erhöhten Ca^{2+}-Gehalt der Leber zurückgeführt werden.

Die Inaktivierung des Cytochrom P450 durch CCl_4-Metabolite ist der erste konkrete Beweis für die Bindungshypothese, nach der die Schädigung der Leber auf die kovalente Bindung von reaktiven CCl_4-Metaboliten an zelluläre Bestandteile zurückzuführen ist. Ein entsprechender Beweis für die Gültigkeit der alternativen Lipidperoxidationshypothese, nach der die Leberschädigung durch CCl_4-Metabolite initiierte, O_2-abhängige Veränderung der Lipidmembran des ER und dabei entstehende Sekundärmetabolite verursacht wird, ist nicht bekannt.

Die suizidale Inaktivierung des Cytochrom P450 durch CCl_4 beinhaltet nicht die Freisetzung des Eisenions aus der prosthetischen Hämgruppe (3.4.4). Dies ist im Gegensatz zu suizidalen Reaktionen des Cytochrom P450 mit CC-Mehrfachbindungen enthaltenden Fremdstoffen, die O_2-abhängig über die Bildung reaktiver Epoxide zur N-Alkylierung des Häms und Freisetzung des Hämeisenions erfolgen. Die CCl_4-Metabolite alkylieren das Häm nicht am Stickstoff des Porphyrinsystems, sondern, wie bereits erwähnt, an den peripheren Vinylgruppen. Das modifizierte Cytochrom P450 bleibt daher im Prinzip katalytisch aktiv, bei allerdings veränderter Substratspezifität. Die neuartige Annahme, daß das modifizierte Cytochrom P450 metabolischer Ort der Lipidperoxidation oder auch der Bildung O_2-abhängiger CCl_4-Metabolite ist, kann einige bisher nicht verstandene Aspekte der CCl_4-Toxizität erklären (3.4.4). So die Entstehung der zentrilobulären Nekrose, die durch Kohlenmonoxid nicht hemmbare CCl_4-bedingte Lipidperoxidation und die erhöhte Empfindlichkeit von Phenobarbital vorbehandelten Tieren gegenüber CCl_4.

Die Änderung der Aktivität anderer mikrosomaler Enzyme durch CCl_4-Metabolismus ist notwendigerweise O_2-abhängig (3.3). Die Nucleosiddiphosphatase wird nicht geschädigt, sondern aktiviert. Die Aktivierung dieses Enzyms ist daher ein direktes Maß O_2-abhängiger Verände-

rungen der mikrosomalen Membran in der Frühphase der CCl_4-Toxizität. Die Glucose-6-Phosphatase und die UDP-Glucuronyltransferase werden direkt inaktiviert, entweder durch Lipidperoxidationsprodukte oder durch O_2-abhängig gebildete CCl_4-Metabolite. Die O_2-unabhängige Alkylierung der mikrosomalen Lipide und Proteine durch CCl_4-Metabolite ist für die Aktivitätsänderungen dieser Enzyme ohne Bedeutung (3.3.2).

Schlußbemerkungen: Die Metabolisierung des CCl_4 durch das endoplasmatische Cytochrom P450 der Leberparenchymzelle ist ein atypisches Beispiel der Giftung von Xenobiotika, die in der Regel in der Phase I der Biotransformation O_2-abhängig erfolgt. Die O_2-unabhängige Giftung des CCl_4 zu reaktiven Metaboliten ist möglicherweise ein archetypisches Relikt der Evolution dieses Enzyms, das in der ursprünglich reduktiven Erdatmosphäre O_2-unabhängige reduktive Funktion besaß. Die Konfrontation dieses Enzyms mit synthetischen chemischen Produkten ohne evolutionären Bezug, wie z.B. CCl_4, führt offenbar zu einem "Fehlverhalten" des Enzyms, das durch die selbst gebildeten Produkte suizidal inaktiviert wird. In Gegenwart des unter heutigen Bedingungen omnipräsenten Sauerstoffs führt die an sich biochemisch sinnvolle Inaktivierung jedoch zu einer im toxischen Sinne Aktivierung des Enzyms. Das lediglich modifizierte Cytochrom P450 katalysiert dann O_2-abhängige Reaktionen, die der biochemischen Kontrolle der Parenchymzelle "entgleiten" und über weitere aufzuklärende Mechanismen zum Untergang der Zelle führen. Diese zur Nekrose führenden Mechanismen sind wahrscheinlich so effektiv, daß Karzinome bewirkende Mechanismen nicht mehr wirksam werden können. Die Modifizierung des Cytochrom P450 durch CCl_4-Metabolite ist anscheinend der essentielle Vorgang der lebernekrotischen Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs.

5 Literaturverzeichnis

(1) Burke,M.D. (1981)
Biochem.Pharmacol. 30, 181-187.

(2) Estabrook,R.W. (1979)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. und Packer,L. Hrsg.)
Band LII Teil C, 43-47,

(3) DePierre,J.W. und Dallner,G. (1975)
Biochim.Biophys.Acta 415, 411-472

(4) Estabrook,R.W., Werringloer,J., Masters,B.S.S., Jonen,T.,
Matsubara,T., Ebel,R., O'Keeffe,D. und Peterson,J.A. (1976)
in The Structural Basis of Membrane Function (Hatefi,H.
und Djavadi-Ohaniance,L. Hrsg.) 429-445
Academic Press, New York.

(5) Brenner,R.R. (1977)
Drug Metab. Rev. 6, 155-212.

(6) Sato,R. und Omura,T. (1978)
Cytochrom P450, Academic Press, New York.

(7) Klingenberg,M. (1958)
Arch.Biochem.Biophys. 75, 376-386

(8) Garfinkel,D. (1958)
Arch.Biochem.Biophys. 77, 493-509

(9) Omura,T. und Sato,R. (1964)
J.Biol.Chem. 239, 2370-2378.

(10) Maines,M.D. und Anders,M.W. (1973)
Arch.Biochem.Biophys. 159, 201-205.

(11) Bothelho,L.H., Ryan,D.E. and Levin,W. (1979)
J.Biol.Chem. 254, 5635-5640.

(12) Haniu,M., Armes,L.G., Tanaka,M. und Yasunobu,K.T. (1982)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 105, 889-894.

(13) Johnson,E.F. (1979)
in Reviews in Biochemical Toxicology (Hodgson,E., Bend,J.R. und Philpot,R.M. Hrsg.) 1, 1-26, Elsevier, New York.

(14) Cramer,S.P., Dawson,J.H., Hodgson,K.O. und Hager,L.P. (1978)
J.Am.Chem.Soc. 100, 7282-7290

(15) Lu,A.Y.H. und Levin,W. (1974)
Biochim.Biophys.Acta 344, 205-240

(16) Bock,K.W. und Remmer,H. (1978)
in Heme and Hemoproteins (DeMatteis,F. und Aldridge,W.N. Hrsg.) 49-80, Springer, Berlin.

(17) Nebert,D.W., Eisen,H.J., Negishi,M., Lang,M.A. und Hjelmeland,L.M. (1981)
Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 21, 431-436.

(18) Sligar,S.G. (1976)
Biochem. 15, 5399-5406.

(19) White,R.E. und Coon,M.J. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 3073-3083.

(20) Backes, W.L., Sligar,S.G. und Schenkmann,J.B. (1982)
Biochem. 21, 1324-1330.

(21) Kumaki,K. und Nebert,D.W. (1978)
Pharmacol. 17, 262-279.

(22) White,E.R. und Coon,M.J. (1980)
Ann.Rev.Biochem. 49, 315-356.

(23) Ullrich,V. (1979)
Top.Curr.Chem. 83, 68-104.

(24) Hildebrandt,A. und Estabrook,R.W. (1971)
Arch.Biochem.Biophys. 143, 66-79

(25) Waterman,M.R. und Mason,H.S. (1972)
Arch.Biochem.Biophys. 150, 57-63.

(26) Wickramasinghe,R.H. und Villee,C.A. (1975)
Nature 256, 509-511.

(27) Gillette,I.R., Kamm,I.I. und Sasame,H.A. (1968)
Mol.Pharmacol. 4, 541-548

(28) Hernandez,P.H., Hazel,P. und Gillette,I.R. (1967)
Biochem.Pharmacol. 16, 1877-1888.

(29) Sugiura,M., Iwasaki,K. und Kato,R. (1976)
Mol.Pharmacol. 12, 322-334

(30) Kato,R., Iwasaki,K., Shiraga,T. und Noguchi,H. (1976)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 70, 681-687

(31) Nastainczyk,W., Ullrich,V. und Sies,H. (1978)
Biochem.Pharmacol.27, 387-392.

(32) Nastainczyk,W., Ahr,H.J. und Ullrich,V. (1982)
Biochem.Pharmacol. 31, 391-396.

(33) Shimada,T., Imai,Y. und Sato,R. (1981)
Chem.-Biol.Interactions 38, 29-44.

(34) Bonse,G., Urban,T., Reichert,D. und Henschler,D. (1975)
Biochem.Pharmacol. 24, 1829-1834

(35) Bartsch,H., Malzveille,C., Barbin,A. und Planche,G. (1978)
Arch.Toxicol. 41, 249-277

(36) Pohl, L.R., Martin,I.L. und George,I.W. (1980)
Biochem.Pharmacol.29, 3271-3276,

(37) Karashina,D., Hirokata,Y., Shigematzu,A. und Furokawa,T. (1977)
J.Pharmacol.Exp.Therap. 203, 409-416

(38) McLain,G.E., Sipes,I.G. und Brown,D.R. (1979)
Anesthesiology 51, 321-326

(39) Ahr,H.J., King,L.J., Nastainczyk,W. und Ullrich,V. (1982)
Biochem.Pharmacol. 31, 383-390.

(40) Butler,T.C. (1961)
J.Pharmacol.Exp.Ther. 134, 311-319.

(41) Fowler,J.S.L. (1969)
Brit.J.Pharmacol. 37, 733-737.

(42) Poyer,J.L., McCay,P.B., Lai,E.K., Janzen,E.G. und Davis,E.R. (1980)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 94, 1154-1160.

(43) Wolf,C.R., Mansuy,D., Nastainczyk, W., Deutschman,G. und Ullrich,V. (1977)
Mol.Pharmacol. 13, 698-705

(44) Ahr,H.J., King,L.J., Nastainczyk,W. und Ullrich,V. (1980)
Biochem.Pharmacol. 29, 2855-2861.

(45) Kubik,V.L. und Anders,M.W. (1981)
Chem.-Biol.Interactions 34, 201-207

(46) Paul,B.B. und Rubinstein,D. (1963)
J.Pharmacol.Exp.Ther. 141, 141-148.

(47) Reiner,O., Athanassopoulos,S., Hellmer,K.H., Murray,R.E. und Uehleke,H. (1972)
Arch.Toxicol. 29, 219-233.

(48) Uehlecke,H., Hellmer,K.H. und Tabarelli,S. (1973)
Xenobiotika 3, 1-11.

(49) Shah,H., Hartmann,S.P. und Weinhouse,S. (1979)
Cancer Res. 39, 3942-3947.

(50) Tomasi,A., Albano,E., Lott,K.A.K. und Slater,T.F. (1980)
FEBS Lett. 122, 303-306

(51) Mico,B.A. und Pohl,L.R. (1982)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 107, 27-31.

(52) Slater,T.F. und Sawyer,B.C. (1971)
Biochem.J. 123, 815-821.

(53) Slater,T.F. und Sawyer,B.C. (1977)
Chem.-Biol.Interactions 16, 359-364.

(54) Uehleke,H., Werner,T., Greim,H. und Kramer,M. (1977)
Xenobiotica 7, 393-400.

(55) Edwards,J.E. (1941)
J.Nat.Cancer Inst. 2, 197-199.

(56) Reuber,M.D. und Glover,E.L. (1967)
J.Nat.Cancer Inst. 38, 891-899.

(57) Smuckler,E.A. (1976)
Panminerva Med. 18, 292-309.

(58) Recknagel,R.O. und Glende,E.A.R.jr. (1973)
CRC Crit.Rev.Toxicol. 2, 263-297.

(59) Recknagel,R.O. (1967)
Pharmacol.Rev. 19, 145-208.

(60) Slater,T.F. (1972)
Free Radical Mechanisms in Tissue Injury, Pion Ltd., London.

(61) Reynolds,E.S. und Yee,A.G. (1976)
Lab.Invest. 16, 591-603.

(62) Gordis,E. (1969)
J.Clin.Invest. 48, 203-209.

(63) Uehleke,H. und Werner,P. (1975)
Arch.Toxicol. 34, 289-308.

(64) Sipes,G., Krishna,G. und Gillette,I.R. (1977)
Life Sci. 20, 1541-1548.

(65) Diaz Gomez,M.I. und Castro,I.A. (1980)
Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 27, 191-194.

(66) Slater,T.F. (1982)
Biochem.Soc.Trans. 10, 70-71.

(67) Reynolds,E.S. und Moslen,M.T. (1980)
in Free Radicals in Biology (Pryor,W., Hrsg.) Bd.4, 49-90, Academic Press, New York.

(68) DeMatteis,F. (1978)
in Heme and Hemoproteins (De Matteis,F. und Aldridge,W.N. Hrsg.) 95-127, Springer, Berlin.

(69) Recknagel,R.O., Glende,E.A.,Jr. und Hruszkewycs,A.M. (1977)
in Free Radicals in Biology (Pryor,W., Hrsg.) Bd.3, 97-132, Academic Press, New York.

(70) Villarruel,M.delC.,de Toranzo,E.G.D. und Castro,J.A. (1976)
Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 14, 193-196.

(71) Kornbrust,D.J. und Mavis,R.D. (1980)
Mol.Pharmacol. 17, 408-414.

(72) Recknagel,R.O. und Goshal,A.K. (1966)
Lab.Invest. 15, 132-146.

(73) Lee,P.Y., McCay,P.B. und Hornbrook,K.R. (1982)
Biochem.Pharmacol. 31. 405-409.

(74) Lindstrom,T.D. und Anders,M.W. (1978)
Biochem.Pharmacol. 27, 563-567.

(75) Smith,M.T., Thor,H., Hartzell,P. und Orrenius,S. (1982)
Biochem.Pharmacol. 31, 19-26.

(76) Kappus,H. und Muliawan,H. (1982)
Biochem.Pharmacol. 31, 597-600.

(77) Frank,H., Hintze,T., Bimboes,D. und Remmer,H. (1980)
Toxicol.Appl.Pharmacol. 56, 337-344.

(78) Benedetti,A., Casini,A.F., Ferrali,M. und Comporti,M. (1977)
Exp.Mol.Pathol. 27, 309-323.

(79) Pryor,W.A., Stanley,J.P. und Blair,E. (1976)
Lipids 11, 370-383.

(80) Sies,H. (1977)
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 358, 1021-1032.

(81) Kieczka,H. und Kappus,H. (1980)
Toxicol.Lett. 5, 191-196.

(82) Estabrook,R.W. und Werringloer,J. (1977)
in Advances in Experimental Medicine and Biology
(Reivich,M. und Mitarb., Hrsg.) Band 78, 19-35,
Plenum Press, New York.

(83) Kratz,F. und Staudinger,Hj. (1965)
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 343, 27-34.

(84) Brauser,B., Sies,H. und Bücher,Th. (1969)
FEBS Lett. 2, 167-169.

(85) Rösen,P. und Stier,A. (1973)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 51, 603-611.

(86) Reiner,O. und Uehleke,H. (1971)
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 352, 1048-1052.

(87) Rösen,P. (1973)
Dissertation, Univ. Hannover.

(88) Kröner,H. und Planker,M. (1977)
Beitr.Path. 160, 245-259.

(89) DeMartino,G.N. (1981)
Arch.Biochem.Biophys. 211, 253-257.

(90) Chien,K.R., Sherman,S.C., Mittnacht,S.Jr. und
Farber,J.L. (1980)
Arch.Biochem.Biophys. 205, 614-622.

(91) Smith,K.M. (1975) in Porphyrins and Metalloporphyrins
(Smith,K.M. Hrsg.) 861-862
Elsevier, Amsterdam.

(92) Pennington,R.J.C. (1961)
Biochem.J. 80, 645-649.

(93) Appelmans,F. und DeDuve,C. (1955)
Biochem.J. 59, 426-433.

(94) Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1972)
Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 10, 182-192.

(95) Goa,J. (1953)
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 5, 218-222.

(96) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. und Randall,R.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193, 265-275.

(97) Schacterle,G.R. und Pollack,R.L. (1973)
Anal.Biochem. 51, 645-655.

(98) Folch,J., Lees,M., Sloane-Stanley,G.H. (1957)
J.Biol.Chem. 226, 497-505.

(99) Burck,H.C. (1961)
Klin.Wschr. 39, 751-754.

(100) Weil-Malherbe,H. und Green,R.H. (1951)
Biochem.J. 49, 286-292

(101) Kates,M. (1972) in Techniques of Lipidology (Work,T.S. und Work,E. Hrsg.) 394, North Holland Publ.Comp., Amsterdam.

(102) Paul,K.G., Theorell,H. und Akeson,A. (1953)
Acta Chem.Scand. 7, 1248-1287.

(103) Masters,B.S.S., Kamin,H., Gibson,Q. und Williams,C.H. (1965)
J.Biol.Chem. 240, 921-931.

(104) Savagne,N. (1957)
Biochem.J. 67, 146-155.

(105) Panfili,E., Sottocasa,G.L. und deBernhard,B. (1971)
Biochim.Biophys.Acta 253, 323-331.

(106) Baginski,E.S., Foa,P.P. und Zak,B. (1974)
in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U., Hrsg.) 909-913, Verlag Chemie, Weinheim.

(107) Scheibe,P., Bernt,E. und Bergmeyer,H.U. (1974)
in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U., Hrsg.) 1999-2005, Verlag Chemie, Weinheim.

(108) Bock,K.W., Fröhling,W., Remmer,H. und Rexer,B. (1973)
Biochim.Biophys.Acta 372, 46-56.

(109) Smuckler,E.A., Pathier,B. und Hultin,T. (1968)
Biochem.J. 107, 151-161.

(110) Richter,G. und Michel,S. (1965)
Acta Biol.med.germ. 15, 667-679

(111) Klaassen,C.D. und Plaa,G.L. (1969)
Biochem.Pharmacol. 18, 2019-2027

(112) Weast,R.C. (1973)
Handbook of Chemistry and Physics (Weast,R.C. Hrsg.)
CRC-Press, Cleveland

(113) Chance,B. ,Oshino,R. und Oshino,N. (1978)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. und Packer,L. Hrsg.) Band LIV, 499-505

(114) Lämmli,U.K. (1970)
Nature 227, 680-685

(115) Weber,K. und Osborne,M.(1969)
J.Biol.Chem. 244, 4406-4412

(116) Glende,E.A.Jr. (1972)
Biochem.Pharmacol. 21, 1697-1702

(117) Burk,R.F. und Lane,J.M. (1979)
Toxicol.Appl.Pharmacol. 50, 467-478

(118) Recknagel,R.O. und Littera,M. (1965)
Amer.J.Pathol. 36, 521-531

(119) Dingell,J.V. und Heimberg,M. (1968)
Biochem.Pharmacol. 17, 1269-1278

(120) Baccino,F.M., Satta,G. und Mameli,L. (1964)
Biochem.Biophys.Acta 90, 606-608

(121) Rao,K.S. und Recknagel,R.O. (1969)
Exp.Mol.Pathol. 10, 219-228

(122) Reuter,F. und Haas,W. (1980)
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 319

(123) Ilett,K.F., Reid,W.D., Sipes,J.G. und Krishna,G. (1973)
Exp.Mol.Path. 19, 215-229

(124) Reynolds,E.S. (1963)
J.Cell.Biol. 19, 139-157

(125) Reynolds,E.S. (1964)
Lab.Invest. 13, 1457-1470

(126) Cantarow,A., Stewart,H.L. und Morgan,D.R. (1938)
J.Pharmacol.Exp.Ther. 63, 153-172

(127a) Greenway,C.V. und Stark,R.D. (1971)
Physiol.Rev. 51, 23-65

(127b) Ullrich,K.J. (1970)
in Physiologie (Keidel,W.D., Hrsg.) 262, Thieme
Verlag, Stuttgart

(128) Mannering,G.J. (1971)
Metabolism 20, 228-245

(129) Hansson,R., Holmberg,I. und Wikvall,K. (1981)
J.Biol.Chem. 256, 4345-4349

(130) Cinti,D.L., Colub,E.E. und Bronner,F. (1976)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 72, 546-553

(131) Arion,W.J., Ballas,L.M., Lange,A.J. und Wallin,B.K. (1976)
J.Biol.Chem. 251, 4901-4907

(132) Ballas,L.M. und Arion,W.J. (1977)
J.Biol.Chem. 252, 8512-8518

(133) Berry,C. und Hallinan,T. (1976)
Biochem.Soc.Trans. 4, 650-652

(134) Reynolds,E.S., Ree,H.J. und Moslen,M.T. (1972)
Lab.Invest. 26, 290-299

(135) Garner,R.C. und McLean,A.E.M. (1969)
Biochem.Pharmacol. 18, 645-650

(136) Masuda,Y. und Murano,T. (1977)
Biochem.Pharmacol. 26, 2275-2282

(137) Glende,E.A.,Hruszkewycz,A. und Recknagel,R.O. (1976)
Biochem.Pharmacol. 25, 2163-2170

(138) Masuda,Y. (1981)
Japan.J.Pharmacol. 31, 107-116

(139) Fander,U., Haas,W. und Kröner,H. (1982)
Exp.Mol.Pathol. 36, 34-43

(140) de Groot,H., Noll,T., Tölle,T. und Haas,W. (1981)
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 362, 204-205

(141) de Groot,H. (1982)
Dissertation,Universität Düsseldorf

(142) de Groot,H., Noll,T. und Haas,W. (1981)
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 362, 204

(143) Smuckler,E.A., Arrhenius,E. und Hultin,T. (1967)
Biochem.J. 103, 55-64

(144) Greene,F.E., Stripp,B. und Gillette,J.R. (1969)
Biochem.Pharmacol. 18, 1531-1533

(145) Levin,W., Jacobson,M. und Kuntzman,R. (1972)
Arch.Biochem.Biophys. 148, 262-269

(146) Levin,W., Lu,A.Y.H., Jacobson,M.,Kuntzman,R., Poyer,I.L. und McCay,P.B. (1973)
Arch.Biochem.Biophys. 158, 842-852

(147) DeMatteis,F. und Sparks,R.G. (1973)
FEBS Lett. 29, 141-144

(148) Schacter,B.A., Marver,H.S. und Meyer,U.A. (1972)
Biochim.Biophys.Acta 279, 221-227

(149) Tenhunen,R., Marver,H.S.,Pimstone,N.R., Trager,W.F., Cooper,D.Y. und Schmid,R. (1972)
Biochem. 11, 1716-1720

(150) Tenhunen,R., Marver,H.S. und Schmid,R. (1968)
Proc.nat.Acad.Sci. 61, 748-755

(151) Archakov,A.I., Panchenko,L.F., Karuzina,I.I. und Aleksandrova,T.A. (1969)
Biokhimiya 34, 604-609

(152) Castro,J.A., Sasame,H.A., Sussman,H. und Gillette,J.R. (1968)
Life Sci. 7, 129-136

(153) de Toranzo,E.G.D., Diaz Domez,M.I. und Castro,J.A. (1975)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 64, 823-828

(154) de Toranzo,E.G.D., Diaz Gomez,M.I. und Castro,J.A. (1978)
Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 19, 347-352

(155) de Groot,H. und Haas,W. (1980)
FEBS Lett. 115, 253-256

(156) de Groot,H. und Haas,W. (1981)
Biochem.Pharmacol. 30, 2343-2347

(157) Kornbrust,D.J. und Mavis,R.D. (1980)
Mol.Pharmacol. 17, 400-407

(158) Slater,T.F. und Sawyer,B.C. (1971)
Biochem.J. 123, 805-814

(159) Hintz,M.J. und Peterson,J.A. (1980)
J.Biol.Chem. 255, 7317-7325

(160) Yamazoe,Y.,Sugiura,M., Kamataki,T. und Kato,R. (1979)
Japan.J.Pharmacol. 29, 715-721

(161) Lindstrom,T.D. und Anders,M.W. (1978)
Toxicol.Lett. 1, 307-314

(162) Guzelian,P.S. und Swischer,R.W. (1979)
Biochem.J. 184, 481-489

(163) Ruf,H.H und Nastainczyk,W. (1976)
Eur.J.Biochem. 66, 139-146

(164) Wolf,C.R., Harrelson,W.G.Jr., Nastainczyk,W.
Philpot,R.M., Kalyanaraman,B. und Mason,R.P. (1980)
Mol.Pharmacol. 18, 553-558

(165) Levin,W., Kuntzman,R.,Alvares,A. und Conney,A.H.
(1971)
Mol.Pharmacol. 7, 500-510

(166) Alvares,A.P. und Siekevitz,P. (1973)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 54, 923-929

(167) Ryan,D.E.,Thomas,P.E., Korzeniowski,D. und Levin,W.
(1979)
J.Biol.Chem. 245, 1365-1374

(168) Nilson,O.G. und Toftgard,R. (1981)
Arch,Toxicol. 47, 1-11

(169) Villarruel,M.delC., Diaz Gomez,M.I. und Castro,J.A.
(1975)
Toxicol.Appl.Pharmacol. 33, 106-114

(170) Noguchi,T., Fong,K.-L., Lai,E.K., Alexander,S.S.,
King,M.M., Olson,L., Poyer,J.L. und McCay, P.B.
(1982)
Biochem.Pharmacol. 31, 615-624

(171) Singh,O.M.P., Graham,A.B. und Wood,G.C. (1981)
Eur.J.Biochem. 116, 311-316

(172) Bock,K.W., Josting,D., Lilienblum,W. und Pfeil,H.
(1979)
Eur.J.Biochem. 98, 19-26

(173) Bentley,P. und Oesch,F. (1975)
FEBS Lett. 59, 291-295

(174) Halpert,J. und Neal,R.A. (1980)
Mol.Pharmacol. 17, 427-431

(175) Bond,E.J. und De Matteis,F. (1969)
Biochem.Pharmacol. 18, 2531-2549

(176) Obrebska,M.J., Kentish,P. und Parke,D.V. (1980)
Biochem.J. 188, 107-112

(177) Stripp,B., Hamrick,M.E. und Gillette,J.R. (1972)
Biochem.Pharmacol. 21, 745-747

(178) Archakov,A.I. und Karuzina,I.I. (1973)
Biochem.Pharmacol. 22, 2095-2104

(179) Ortiz de Montellano,P.R., Kunze,K.L., Beilan,H.S. und Wheeler,C. (1982)
Biochem. 21, 1331-1339

(180) Ortiz de Montellano,P.R., Beilan,H.S., Kunze,K.L. und Mico,B.A. (1981)
J.Biol.Chem. 256, 4395-4399

(181) Ortiz de Montellano,P.R. und Mico,B.A. (1981)
Arch.Biochem.Biophys. 206, 43-50

(182) Ortiz de Montellano,P.R., Kunze,K.L., Yost,G.S. und Mico, B.A. (1979)
Proc.Natl.Acad.Sci. 76, 746-749

(183) Ortiz de Montellano,P.R., Kunze,K.L. und Mico,B.A. (1980)
Mol.Pharmacol. 18, 602-605

(184) Ortiz de Montellano,P.R. und Kunze,K.L. (1980)
J.Biol.Chem. 255, 5578-5585

(185) De Matteis,F. und Cantoni,L. (1979)
Biochem.J. 183, 99-103

(186) Ortiz de Montellano,P.R., Mico,B.A. und Yost,D.S. (1978)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 83, 132-137

(187) Dixon,M. (1971)
Biochim.Biophys.Acta 226, 241-258

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Lehrstuhl I, der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Den Institutsdirektoren, Herrn Prof.Dr.S. Hollmann und Herrn Prof.Dr.H. Sies danke ich für die ideelle Unterstützung dieser Arbeit sowie die großzügige Förderung mit Sach- und Personalmitteln.

Herrn Prof.Dr.H. Kröner gilt mein besonderer Dank für die Anregung und stets kritische Beurteilung dieser Untersuchung.

Dank gebührt allen Mitarbeitern, die direkt oder im Umfeld der Problemstellung mitgearbeitet haben, insbesonders Herrn W. Langer als technischer Assistent.

Teile dieser Arbeit wurden dankenswerterweise seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch Sach- und Personalmittel im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Mechanismen toxischer Wirkungen von Fremdstoffen" gefördert.